
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS DO CUPIM NEOTROPICAL
Nasutitermes aquilinus (ISOPTERA: TERMITIDAE)

Iago Bueno da Silva

IAGO BUENO DA SILVA

ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS DO CUPIM NEOTROPICAL

Nasutitermes aquilinus (ISOPTERA: TERMITIDAE)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Costa Leonardo

Coorientador: Prof. Dr. Ives Haifig

Rio Claro - SP

2019

S586e Silva, Iago Bueno
 Estratégias reprodutivas do cupim Neotropical
 Nasutitermes aquilinus (Isoptera: Termitidae) / Iago
 Bueno Silva. -- Rio Claro, 2019
 70 p. : il., tabs., fotos

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
 (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
 Orientadora: Ana Maria Costa Leonardo
 Coorientador: Ives Haifig

 1. reprodução. 2. Nasutitermitinae. 3. Neotênicos
 ergatoides. 4. marcadores microssatélites. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

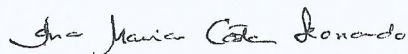
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS DO CUPIM NEOTROPICAL *Nasutitermes aquilinus* (ISOPTERA: TERMITIDAE)

AUTOR: IAGO BUENO DA SILVA

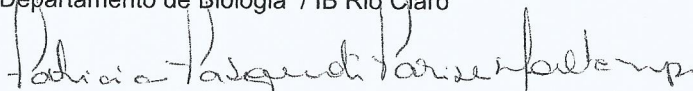
ORIENTADORA: ANA MARIA COSTA LEONARDO

COORDENADOR: IVES HAIFIG

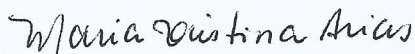
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ANA MARIA COSTA LEONARDO
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. MARIA CRISTINA ARIAS
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva / Universidade de São Paulo

Rio Claro, 18 de fevereiro de 2019

À Nair, José, Bruna, Maryani e Makuta, dedico.

Agradecimentos

Este trabalho não seria possível sem o apoio de inúmeras pessoas, fosse pela ajuda com métodos de laboratório ou através de simples conversas para aliviar a pressão.

Gostaria de agradecer a minha família, Nair, José e Bruna, por sempre me apoiarem em minhas decisões. Mesmo não tendo conhecimento sobre o mundo dos cupins, sempre reconheceram meu esforço estudando este grupo e também sua importância.

À Maryani, que desde 2013 acompanha meu amor pela pesquisa e pela ciência, sendo paciente e otimista nos momentos em que eu não era. Sem dúvida, sua parceria e todo o seu amor foram fundamentais, não só para que eu permanecesse forte diante das dificuldades, mas para o meu crescimento pessoal. Eu te amo.

À Ana Marcato, por ser um pilar na minha caminhada científica, sempre com sugestões e críticas construtivas, que sem dúvida me fizeram enxergar meu trabalho de outra forma. A área acadêmica precisa de mais pessoas como você!

Aos membros do Laboratório de Cupins, pela dedicação e compromisso, principalmente Van, Célia e Amanda, pela ajuda em campo e no laboratório.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo 2017/04525-1.

Ao GECEA (Grupo de Estudos de Citogenética e Evolução Animal) por ceder o laboratório para condução das análises genéticas, e aos colegas Murilo, Vanessa, Ana Beatriz, Carol, Luísa e Diogo, pela ajuda com os métodos, dicas e conversas.

À minha orientadora, Profa. Ana Maria Costa Leonardo, por ser incansável no ensino da biologia de cupins, contagiando outras pessoas com o seu amor pela ciência. Obrigado pelos conselhos e pela dedicação durante todos estes anos.

Ao meu coorientador, Prof. Ives, por toda a ajuda na coleta e análise de dados, além do conhecimento transferido durante coletas de campo, laboratório e congressos.

A todos os funcionários com os quais convivi nestes dois anos, por um simples “bom dia” até os conselhos mais valiosos.

Resumo

Estudos recentes têm sugerido um novo panorama para a reprodução dos cupins, embora existam muitas lacunas, principalmente em relação aos cupins neotropicais da família Termitidae. O aparecimento de reprodutores neotênicos em algumas espécies de Isoptera já está bem documentado, mas a contribuição para a dinâmica da colônia dos reprodutores neotênicos ergatoides, derivados de operários, permanece desconhecida. *Nasutitermes aquilinus*, espécie abordada na presente pesquisa, é um cupim Neotropical que comumente apresenta reprodutores neotênicos ergatoides. Contudo, os estudos disponíveis na literatura se limitam a descrições morfológicas destes reprodutores. Assim, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar a estrutura reprodutiva e genética de *N. aquilinus* envolvendo reprodutores ergatoides, utilizando marcadores de microssatélites e mitocondriais. Além disso, análises morfológicas e histológicas foram utilizadas para avaliar as características imaginais, o grau de maturação do sistema reprodutor, tipo de corpo gorduroso e presença de espermatozoides nas espermatecas das fêmeas ergatoides amostradas nos ninhos. Cinco marcadores microssatélites foram utilizados para genotipar 258 indivíduos provenientes de 11 ninhos, incluindo 43 fêmeas ergatoides. O gene mitocondrial COI foi sequenciado em todas as fêmeas ergatoides para determinar a linhagem materna nas colônias onde estas fêmeas neotênicas estavam presentes. As fêmeas ergatoides apresentaram diferentes graus de fisogastria e algumas características imaginais. As análises histológicas do abdome destas fêmeas mostraram ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento, incluindo estágios vitelogênicos terminais, além de corpo gorduroso real e espermatozoides no lúmen da espermateca. De acordo com as análises moleculares, oito colônias de *N. aquilinus* foram classificadas como famílias simples, com quantidade de alelos e genótipos compatíveis com a monogamia. Os ninhos N2, N6 (ambos com presença de ergatoides) e N3 (com ausência de ergatoides) apresentaram genótipos inconsistentes para endogamia, possibilitando a ocorrência de famílias estendidas. Pelo fato de somente quatro alelos serem identificados por ninho, a ocorrência de famílias mistas, a qual inclui reprodutores não aparentados, foi suprimida para *N. aquilinus*. No entanto, a baixa diversidade de alelos pode ter mascarado a ocorrência destas famílias. Os índices de diversidade genética (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}) apontaram baixa endogamia e diversidade genética moderada, mesmo com a possível formação de famílias estendidas (N2, N3, N6), as quais tendem a perder diversidade genética em decorrência da reprodução entre aparentados. Sendo assim, fêmeas neotênicas ergatoides possivelmente estão atuando em ciclos simples de endogamia nestas colônias, de modo que a diversidade genética e taxa de endogamia não se iguale àquelas observadas normalmente em

famílias estendidas. Na colônia N11, mesmo com as fêmeas ergatoides apresentando espermatozoides na espermateca e ovócitos vitelogênicos terminais, os genótipos indicaram reprodução envolvendo somente um casal de reprodutores, sugerindo que estas fêmeas estão em estágios iniciais de oviposição ou que a amostragem de castas não contemplou os descendentes destas fêmeas.

Palavras-chave: genotipagem, marcadores de microssatélites, mtDNA, maturação reprodutiva, Nasutitermitinae, neotênicos ergatoides, reprodução, ovócitos.

Abstract

Recent investigations have shown a new perspective concerning the termite reproduction, although many questions remain answered, principally in the Neotropical representatives of the family Termitidae. The development of neotenic reproductives in some species within Isoptera is well established, but the development and reproductive contribution of the ergatoid neotenic, which differentiate from workers, are still unknown. *Nasutitermes aquilinus*, a Neotropical species investigated in the present study, usually develops ergatoid reproductives after the death of the royal couple. However, previous investigations available for *N. aquilinus* are limited to morphological descriptions of these reproductives. Thus, the objective of the present study was to investigate the reproductive and genetic structure involving ergatoid reproductives in *N. aquilinus*, using microsatellite and mitochondrial markers. Additionally, morphological and histological analyses were performed to evaluate the presence of imaginal characteristics, maturation of the reproductive organs, type of fat body, and presence of spermatozoa inside the spermatheca of the ergatoid females. In total, 258 individuals from 11 nests, including 43 ergatoid females, were genotyped using five microsatellite loci. The mitochondrial gene COI was sequenced in all the ergatoid neotenic, aiming to identify the matriline present in the colonies. The ergatoid females presented different physogastry rate and some imaginal traits. Histological sections of the abdomen of ergatoid females showed oocytes in different stages, including terminal vitellogenic oocytes, along with spherical and aflagellate spermatozoa inside the spermatheca. According to the molecular analyses, nine colonies of *N. aquilinus* were classified into simple families, with alleles and genotypes consistent with monogamy. The nests N2, N6 (both with sampled ergatoids) and N3 (with ergatoids absent) presented genotypes inconsistent with a single pair of reproductives, thus these colonies were classified as possible extended families. Mixed families, which present unrelated reproductives, were not identified for *N. aquilinus*, due the presence of no more than four alleles per nest. However, the low allele diversity may have obfuscated the occurrence of mixed families. The F -statistics (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}) pointed a low inbreeding rate and high genetic diversity, even in colonies classified as possible extended families (N2, N3 and N6), which generally suffer the loss of genetic diversity due a reproductive system involving related individuals. Therefore, it is possible that those colonies present simple cycles of inbreeding, and the genetic diversity and endogamy rate do not follow the values usually observed in extended families. In the colonies N11, the genotypes indicated a breeding system involving only a pair of reproductives, although ergatoid females from these nests presented spermatozoa in the spermatheca and terminal vitellogenic oocytes. In this case,

it is suggested that the ergatoid females from this nest have just started their first oviposition cycle, or their offspring was not genotyped in our genetic analyses.

Keywords: genotyping, microsatellite markers, mtDNA, reproductive maturation, Nasutitermitinae, ergatoid neotenic, reproduction, oocytes.

Sumário

1. Introdução geral	10
1.1. Composição do ninho	10
1.2. Diferenciação das castas	11
2. Revisão bibliográfica	14
2.1. Estrutura reprodutiva em Termitidae	17
2.2. O gênero <i>Nasutitermes</i>	19
2.3. Estratégias reprodutivas em <i>Nasutitermes</i>	20
2.4. Poliginia primária e reprodução secundária em <i>Nasutitermes</i> spp	21
2.5. Impacto genético dos reprodutores secundários	23
2.6. Mecanismos reprodutivos e potencial praga em <i>Nasutitermes</i> spp	24
2.7. A espécie <i>Nasutitermes aquilinus</i>	26
3. Objetivos gerais.....	28
4. Material e métodos	29
4.1. Cupins	29
4.2. Morfologia e morfometria dos reprodutores	30
4.3. Histologia	31
4.4. Análises genéticas	31
4.4.1. Seleção de primers	31
4.4.2. Amplificação por PCR.....	32
4.4.3. Genotipagem.....	33
4.4.4. Sequenciamento e identificação de haplótipos mitocondriais	33
5. Resultados	34
5.1. Morfologia externa e morfometria dos reprodutores	34
5.2. Histologia.....	36
5.3. Genotipagem.....	40
5.4. Sequenciamento e identificação de haplótipos mitocondriais	41
6. Discussão	42
7. Considerações gerais.....	46
8. Referências.....	47
9. Anexos	59

1. Introdução geral

Os cupins são insetos eussociais da ordem Blattaria, infraordem Isoptera (INWARD et al., 2007; KRISHNA et al., 2013). A eussocialidade é atribuída a estes insetos, pois em suas colônias ocorre divisão reprodutiva de tarefas, cuidado cooperativo com a prole e sobreposição de gerações (WILSON; HÖLLDOBLER, 2005). No passado, os cupins eram classificados como uma ordem a parte e, atualmente, estão incluídos na mesma ordem das baratas, resultado de abordagens filogenéticas, moleculares e morfológicas, as quais apontaram estes insetos como sendo grupo irmão do gênero de baratas *Cryptocercus* (NALEPA; LENZ, 2000; LO et al., 2000; INWARD et al., 2007). Segundo Inward et al (2007), os cupins evoluíram de baratas onívoras ancestrais, as quais eram diploides e apresentavam ootecas para proteger os ovos contra dessecação. É sugerido que a evolução da eussocialidade nos cupins influenciou na perda da ooteca, uma vez que a construção de ninhos propiciava um ambiente com clima controlado. Além disso, a formação de sociedades permanentes pode ter conduzida à evolução das castas estéreis (operários e soldados) em resposta a necessidade de busca por alimento, cuidado aloparental da prole e defesa da colônia (HIGASHI et al., 2000).

Os Isoptera abrangem nove famílias (Mastotermitidae, Hodotermitidae, Archotermopsidae, Stolotermitidae, Kalotermitidae, Stylotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae), sendo as quatro últimas incluídas no clado Neoisoptera (ENGEL et al., 2009). A família Termitidae possui radiação mais recente, compreendendo aproximadamente 85% dos gêneros e 70% das espécies de cupins (OHKUMA et al., 2004; ENGEL et al., 2009). Admite-se que Termitidae surgiu na África durante o Eoceno, há 54 milhões de anos, atingindo outras regiões do planeta por meio de pelo menos 24 eventos de dispersão (BOURGUIGNON et al., 2014; 2017). Os Termitidae estão distribuídos em oito subfamílias, das quais quatro estão presentes na região Neotropical, incluindo no Brasil: Termitinae, Apicotermitinae, Nasutitermitinae e Syntermitinae. Na subfamília Nasutitermitinae estão incluídos os cupins do gênero *Nasutitermes*, com um total de 76 espécies neotropicais (CONSTANTINO, 2018).

1.1. Composição do ninho

Uma colônia de cupins possui diferentes castas, as quais atuam de forma coordenada nas mais variadas tarefas. As *larvas* e *ninfas* são os indivíduos imaturos da colônia, os quais se diferenciam em indivíduos da linhagem áptera ou reprodutiva. As *ninfas* apresentam brotos

alares e se originam de larvas ápteras, sendo que sofrem sucessivas mudas até atingirem o estado de imago na linhagem reprodutiva. Em cada muda, ocorre uma diferenciação gradual de característica imaginiais, como surgimento de asas, olhos e órgãos reprodutores. Além dos indivíduos imaturos, na colônia de cupins existem indivíduos estéreis e férteis, estes últimos responsáveis pela reprodução. Os *operários* constituem uma casta estéril e áptera, responsável pela construção e manutenção do ninho, além do forrageamento e alimentação de castas dependentes. Famílias mais basais não possuem operários e sim falsos operários (“pseudergates”) (Fig. 1), que constituem uma casta totipotente, com capacidade de se diferenciar em indivíduos reprodutores, dependendo das condições ambientais do ninho. Os *soldados* também são ápteros e estéreis, sendo responsáveis pela defesa da colônia, já que possuem adaptações morfológicas e fisiológicas para tal função. Já os *reprodutores* alados ou imagos são aqueles indivíduos que iniciam uma colônia, e depois de estabelecida, como fundadores do ninho, são conhecidos como reprodutores primários. Contudo, os que substituem os primários em uma eventual morte, são denominados reprodutores secundários (WILSON, 1971). Estes reprodutores secundários podem se originar de operários (ergatoides), ninfas (ninfoides) ou de reprodutores alados (adultoides), sendo as duas primeiras formas denominadas neotênicas (MYLES, 1999). Portanto, um reprodutor neotênico é um indivíduo que amadurece o aparelho reprodutor sem alcançar a idade adulta (NOIROT, 1989). Em casos excepcionais, e somente em cupins basais, podem aparecer soldados neotênicos (JOHNSON et al., 2011). Diferente dos Hymenoptera, os cupins são insetos hemimetábolos e possuem colônias bissexuais (NOIROT, 1989; MATSUURA, 2010). Sendo assim, estágios imaturos e de ambos os sexos são capazes de executar diferentes tarefas na colônia, incluindo as reprodutivas, por meio da diferenciação de reprodutores neotênicos (NOIROT, 1989).

1.2. Diferenciação das castas

O desenvolvimento das castas em cupins pode ocorrer de duas formas: diferenciação linear e bifurcada. Na diferenciação linear (Fig. 1), existe uma casta totipotente, que é denominada falso operário (“pseudergate”). Esta casta pode sofrer mudas estacionárias ou se diferenciar em ninfas, as quais continuam sofrendo mudas até se tornarem alados, ou estas ninfas podem sofrer mudas regressivas, voltando ao estágio de pseudergate (ROISIN; KORB, 2010). Assim, o desenvolvimento de castas em espécies que adotam a diferenciação linear é plástico e uma muda irreversível ocorre somente em estágios tardios do desenvolvimento. Os fatores que determinam o tipo de diferenciação em falsos operários (“pseudergates”) são principalmente ambientais, tais como temperatura, oferta de alimento, ações de feromônios e

interações sociais com companheiros do ninho (NOIROT; BORDEREAU, 1991; WATANABE et al., 2014). A alteração na síntese de hormônio juvenil (JH) é um dos principais responsáveis pela diferenciação de castas em insetos sociais e desempenha grande influência nas diferentes transformações sofridas por pseudergates em cupins (CORNETTE et al., 2008).

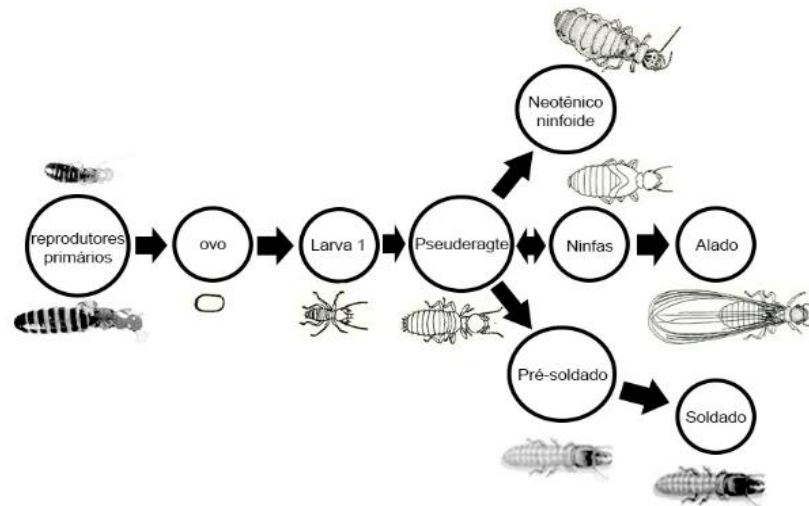


Figura 1. Padrão de desenvolvimento linear de castas. A larva se diferencia em um instar larval tardio, conhecido como pseudergate. Este indivíduo é totipotente, podendo se diferenciar em outras castas ou sofrer mudas estacionárias (Adaptado de GRASSÉ, 1982).

A segunda forma de desenvolvimento consiste na diferenciação “bifurcada” (Fig. 2), onde ocorre separação precoce e irreversível entre as linhagens áptera e reprodutiva (ROISIN, 2000; HARTKE; BAER, 2011). Aproximadamente 80% das espécies de cupins apresentam desenvolvimento de castas bifurcado, sendo que a grande maioria da prole sofre uma muda irreversível para a linhagem áptera e estéril, compondo os operários verdadeiros e os soldados (ROISIN, 2000; HAYASHI et al., 2007). Em contrapartida, uma parte menor da prole se diferencia na linhagem reprodutiva, a qual também é irreversível e caracterizada pelo desenvolvimento gradual de asas, olhos e órgãos reprodutores (MAEKAWA et al., 2008). O padrão bifurcado de desenvolvimento e, conseqüentemente, o surgimento de operários verdadeiros aparece como uma condição derivada em cupins, não ocorrendo em espécies do gênero *Prorhinotermes* (Rhinotermitidae) e nas famílias Kalotermitidae, Termopsidae e Serritermitidae, onde existem falsos operários (BOURGUIGNON et al., 2009; ROISIN; KORB, 2010, BARBOSA; CONSTANTINO, 2017). Na família Termitidae, os operários sempre se diferenciam após dois estágios larvais, exceto na subfamília Macrotermitinae, onde os operários são precedidos de três instares larvais (MILLER, 1969).

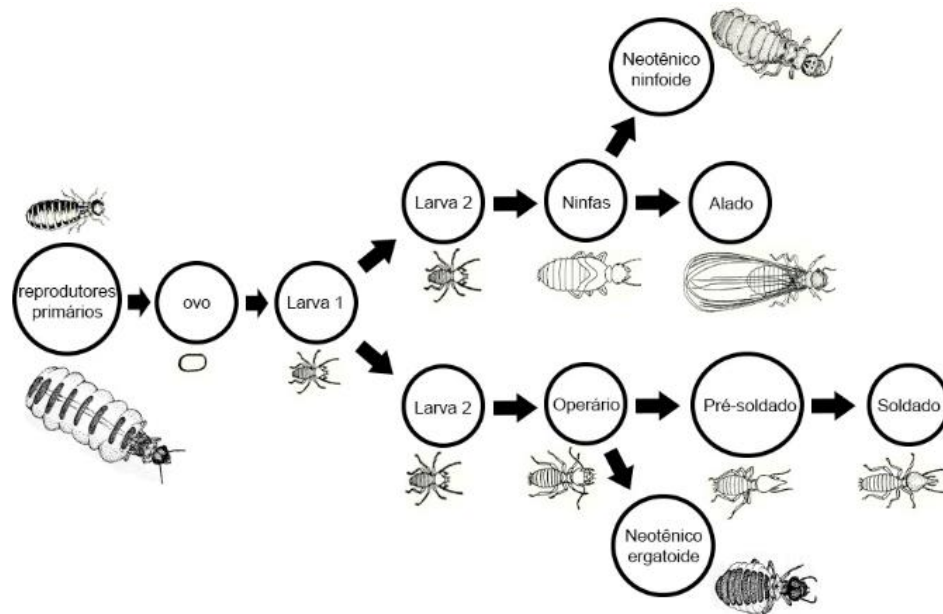


Figura 2. Padrão de desenvolvimento bifurcado de castas. A linhagem reprodutiva (ninfas e alados) e a áptera (operários e soldados) se diferenciam de modo irreversível e precoce. Os operários são verdadeiros, podendo sofrer muda terminal para uma casta de defesa ou para um reprodutor neotênico ergatoide (Adaptado de GRASSÉ, 1982).

De acordo com a origem, quantidade e o parentesco dos reprodutores em uma colônia, as sociedades de cupins podem ser classificadas como famílias simples, nas quais todos os indivíduos são filhos de um único casal real; famílias estendidas, em que todos os indivíduos descendem de reprodutores secundários aparentados; e famílias mistas, com múltiplos reprodutores não aparentados envolvidos nas tarefas reprodutivas (VARGO; HUSSENER, 2010). Uma vez que colônias possuem sinais específicos, facilitando o reconhecimento de companheiros de ninhos e intrusos, os custos e benefícios da fusão de colônias têm sido investigada em diferentes insetos sociais (KRONAUER et al., 2010; KORB; ROUX, 2012). O sucesso na fusão de colônias pode estar associado à baixa diversidade genética decorrente de eventos como os “gargalos de garrafa”, os quais reduzem a discriminação entre companheiros de ninho e indivíduos oriundos de outras colônias (GARCIA et al., 2003). No entanto, a fusão de colônias com alta diversidade genética também tem sido observada, indicando que outros mecanismos estão associados à tolerância entre indivíduos de ninhos diferentes (ADAMS et al., 2007; LUCHETTI et al., 2013).

2. Revisão bibliográfica

A reprodução das colônias de cupins, geralmente, é função do casal real, o rei e a rainha (Figura 3), os quais são denominados reprodutores primários (THORNE, 1996). A fundação de um ninho ocorre logo após o voo nupcial, um evento sazonal caracterizado pela liberação de alados das colônias, os quais formam pares e procuram um local propício para construir a câmara real (NUTTING, 1969; RAINA et al., 2007). Estes voos normalmente ocorrem em sincronia com condições ambientais favoráveis, como períodos chuvosos e quentes (MITCHELL, 2008). Além disso, a liberação de reprodutores alados pode ocorrer de forma concomitante em colônias da mesma espécie, de modo a aumentar as chances de sobrevivência destes alados e favorecer a diversidade genética das futuras colônias (WEESNER, 1960; MITCHELL, 2007). Uma vez que a colônia é estabelecida, o casal real desempenha cuidado parental com a prole (ROSENGAUS; TRANIELLO, 1991; CHOUVENC; SU, 2017) e, quando os primeiros operários aparecem, estes passam a cuidar dos ovos e dos indivíduos imaturos, caracterizando um cuidado alop parental. A partir deste momento, os reprodutores primários investem energia exclusivamente na reprodução, tornando-se dependentes dos operários para sobreviver (CHOUVENC; SU, 2017).

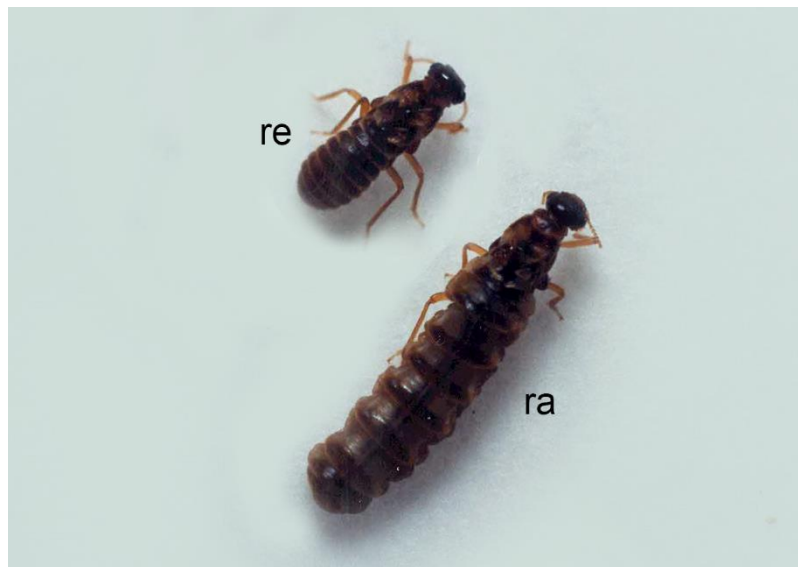


Figura 3. Reprodutores primários de *N. coxipoensis*. O desenvolvimento da fisogastry é característica na rainha (ra), consequência do desenvolvimento dos ovários, juntamente com síntese de tegumento e expansão da membrana artrodial. re = rei. Foto: Ana Maria Costa Leonardo.

Em algumas espécies de Isoptera, a ausência dos reprodutores primários é precedida pela diferenciação de reprodutores secundários, os quais assumem as tarefas reprodutivas da colônia. Neste caso, estes indivíduos são denominados “reprodutores de substituição”. Quando ocorre a diferenciação de reprodutores secundários ainda na presença do casal real, é utilizado o termo “reprodutores suplementares” para os referidos indivíduos (MYLES, 1999; ROISIN, 2000). Estes reprodutores secundários podem se originar tanto de indivíduos imaturos, quanto de adultos. No primeiro caso, os indivíduos são denominados “neotênicos” (Figura 4A-B), uma vez que desenvolvem os órgãos reprodutores antes de atingirem a fase adulta, caracterizada por uma muda imaginal (NOIROT, 1989; MYLES, 1999; ROISIN, 2000). Quando os reprodutores secundários se originam de alados, estes são conhecidos como “adultoídes”, e distinguir estes dos reprodutores primários pode ser bastante difícil.

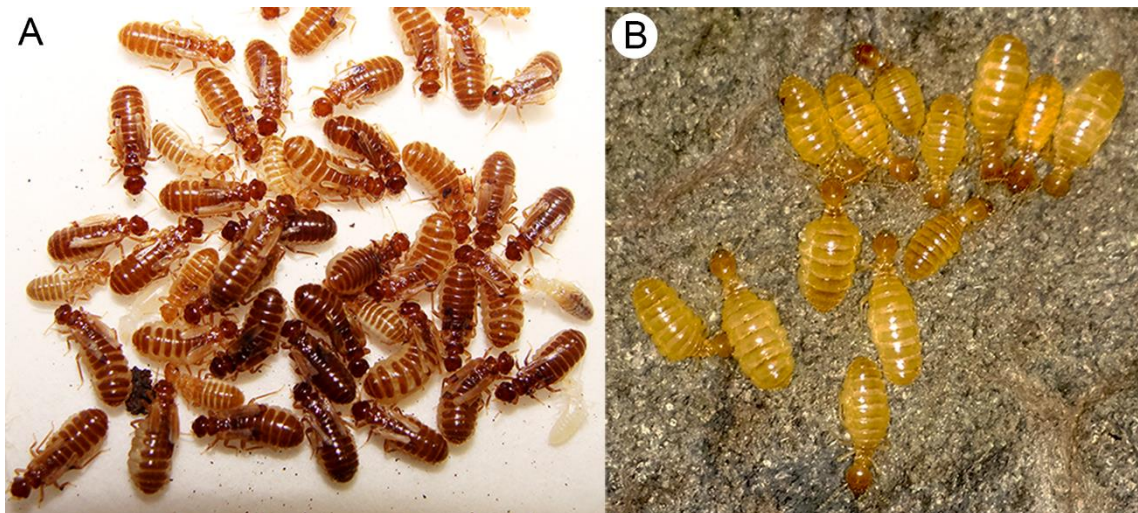


Figura 4A. Reprodutores neotênicos ninfoídes de *Silvestritermes euamignathus*. **B.** Fêmeas neotênicas ergatoides amostradas em ninhos de *Nasutitermes aquilinus*. Foto A: Ives Haifig. Foto B: Iago Bueno da Silva.

Os reprodutores neotênicos ergatoides são derivados de operários e, por esta razão, mantêm algumas características morfológicas da casta operária (MYLES, 1999; TORALES; CORONEL, 2006). No entanto, o desenvolvimento de características reprodutivas é evidente, incluindo a maturação dos órgãos reprodutores, fisogastria (hipertrofia abdominal) nas fêmeas e, em alguns casos, a presença de características imaginiais, como olhos e rudimentos de asas (MIURA; MATSUMOTO, 1996; MIURA, 2001; ROISIN; KORB, 2010). De um modo geral, os reprodutores ergatoides são menos frequentes e menos férteis em comparação aos outros, sendo rapidamente substituídos por reprodutores neotênicos ninfoídes (derivados de ninfas) em algumas espécies (ROISIN, 1990).

Reprodutores neotênicos foram descritos como originados de ninfas de 3º, 4º e 5º instares (BARBOSA et al., 2012; HAIFIG; COSTA-LEONARDO, 2016; HELLEMANS et al., 2017). Uma vez que as ninfas desenvolvem progressivamente algumas características imaginais, como os olhos e asas, os reprodutores neotênicos ninfoides retêm estas estruturas (MATSUURA, 2017). Comparados aos ergatoides, os ninfoides aparecem com mais frequência, principalmente em espécies de Termitidae (EVANS, 2010). A diferenciação de reprodutores neotênicos ninfoides é essencial em espécies de cupins que desenvolvem o sistema reprodutivo conhecido como Sucessão Assexual da Rainha (do inglês Asexual Queen Succession – AQS). Neste processo, as rainhas alternam a forma de reprodução, produzindo parte da prole por partenogênese e parte por reprodução sexuada (MATSUURA, 2017). Todas as fêmeas geradas por partenogênese possuem predisposição genética para se diferenciarem em fêmeas reprodutoras secundárias ninfoides, as quais substituem a rainha primária em sua ausência. Uma vez que as fêmeas reprodutoras secundárias possuem somente informação genética materna, os genes da rainha se perpetuam na colônia, mesmo após sua morte (MATSUURA et al., 2009). As outras castas continuam sendo geradas por reprodução sexuada, mantendo a diversidade genética dentro da colônia. O sistema AQS já foi descrito em espécies de Rhinotermitidae (MATSUURA et al., 2009; VARGO et al., 2012; LUCHETTI et al., 2013) e Termitidae (FOURNIER et al., 2016; FOUGEYROLLAS et al., 2015, 2017; HELLEMANS et al., 2016), sugerindo que este complexo mecanismo tenha evoluído de forma independente entre as espécies que o adotam (DEDEINE et al., 2016, MATSUURA, 2017).

Os reprodutores adultoides são originados de imagos ou reprodutores alados. Estes indivíduos perdem as asas e permanecem no ninho natal ao invés de saírem para o voo nupcial. Contudo, como um reprodutor alado já sofreu uma muda imaginal, os reprodutores adultoides não são classificados como neotênicos (MYLES, 1999; ROISIN, 2000). Estes reprodutores são morfológicamente diferentes dos ergatoides e ninfoides, ao passo que são similares aos reprodutores primários. Assim como os reprodutores ninfoides, os adultoides ocorrem com maior frequência entre as espécies de Termitidae, sendo, até agora, a única forma de reprodução secundária observada nas subfamílias Apicotermatinae e Macrotermatinae (MYLES, 1999; NEOH et al., 2010; BOURGUIGNON et al., 2016). Em casos excepcionais, como aqueles verificados em cupins do gênero *Zootermopsis*, “soldados neotênicos” se diferenciam dentro das colônias, caracterizando uma terceira forma de reprodutores neotênicos (JOHNSON et al., 2011).

O aparecimento de reprodutores secundários em uma colônia pode ter um impacto variado no crescimento populacional da mesma, assim como na taxa de endogamia e variabilidade genética. Referente à estrutura genética, que envolve a origem e o parentesco entre reprodutores, as famílias de cupins podem ser classificadas como simples, estendidas ou mistas (VARGO; HUSSENER, 2010). *Famílias simples* são aquelas onde somente um casal de reprodutores está envolvido com a reprodução, de modo que todos os indivíduos da colônia são filhos deste único casal. Por isso, a colônia apresenta uma diversidade alélica de no máximo quatro alelos, e somente um haplótipo materno é encontrado (ATKINSON; ADAMS, 1997a; ROY et al., 2010; VARGO; HUSSENER, 2010; VARGO et al., 2013). Nas *famílias estendidas*, múltiplos reprodutores aparentados são responsáveis pelas tarefas reprodutivas (GOODISMAN; CROZIER, 2002; ATKINSON et al., 2008; PARMAN; VARGO, 2008). Ainda que um máximo de quatro alelos seja identificado nestas colônias, cinco genótipos podem aparecer, decorrente de uma combinação de alelos inconsistente com a reprodução envolvendo somente dois indivíduos. Adicionalmente, um único haplótipo materno é encontrado nestas colônias (BULMER et al., 2001; VARGO, 2003). Já as *famílias mistas* são formadas por múltiplos reprodutores não aparentados. As principais características genéticas destas colônias são a presença de mais de cinco alelos e a ocorrência de mais de um haplótipo mitocondrial, indicando diferentes linhagens maternas. Ademais, o índice de parentesco entre os indivíduos tende a ser menor em famílias mistas, resultando em uma maior diversidade genética da prole (PARMAN; VARGO, 2008; HAIFIG et al., 2016). É importante ressaltar que as famílias estendidas recebem atenção especial, visto que a ocorrência de múltiplos reprodutores de mesma origem genética pode aumentar a taxa de endogamia dentro das colônias, além de reduzir a diversidade genética (GOODISMAN; CROZIER, 2002; VARGO; HUSSENER 2010).

2.1. Estrutura reprodutiva em Termitidae

Termitidae é a família mais diversa entre os cupins, com aproximadamente 2144 espécies distribuídas em oito subfamílias: Apicotermitinae, Cubitermitinae, Foraminitermitinae, Macrotermitinae, Nasutitermitinae, Sphaerotermitinae, Syntermitinae e Termitinae (CONSTANTINO, 2018). Esta diversidade de espécies é acompanhada por uma estrutura reprodutiva variada, com uma tendência de diminuição da ocorrência de reprodutores neotênicos comparada àquela existente em outras famílias (MYLES, 1999). Reprodutores secundários já foram descritos em Termitidae, com exceção das subfamílias Foraminitermitinae e Sphaerotermitinae, as quais não foram contempladas com estudos de reprodução.

A reprodução sexuada é predominante entre os cupins, incluindo os Termitidae, contudo, a ocorrência de partenogênese já foi descrita para algumas espécies desta família, estando esta forma de reprodução relacionado ao sistema AQS (FOUGEYROLLAS et al., 2015, 2017; FOURNIER et al., 2016; HELLEMANS et al., 2016) ou não (STANSLY; KORMAN, 1993). Além disso, os reprodutores neotênicos associados à partenogênese são sempre ninfoides, sendo os operários produzidos de forma sexuada visando manter a diversidade genética da colônia. Portanto, é pouco provável que a diferenciação de reprodutores ergatoides em algumas colônias esteja relacionada com um sistema reprodutivo similar ou igual ao AQS (VARGO et al., 2012; HUANG et al., 2013).

Nos cupins da subfamília Apicotermitinae, não há registros de reprodutores neotênicos em colônias naturais ou incipientes (SANDS, 1972; BOURGUIGNON et al., 2016). O mesmo ocorre em espécies da subfamília Macrotermitinae, onde reprodutores derivados de operários e ninfas nunca foram coletados. Para ambas subfamílias, o desenvolvimento de reprodutores adultoides parece ser a única forma de substituição do casal real já descrita na literatura (NOIROT, 1956; MYLES, 1999; NEOH et al., 2010; BOURGUIGNON et al., 2016). No entanto, estudos sobre a reprodução ainda são escassos nestas subfamílias. Entre os Cubitermitinae, reprodutores derivados de operários só foram registrados em *Cubitermes severus*, ao passo que algumas espécies desenvolvem reprodutores secundários adultoides (NOIROT, 1969; MYLES, 1999). O sistema reprodutivo é mais complexo entre as espécies de Syntermitinae e Termitinae, tanto na ocorrência de reprodutores secundários (Figura 5), quanto no desenvolvimento de mecanismos reprodutivos associados ao sistema AQS (COSTA-LEONARDO et al., 1998; BARBOSA et al., 2012; FOUGEYROLLAS et al., 2015, 2017; FOURNIER et al., 2016; HAIFIG et al., 2016; HELLEMANS et al., 2016). A partenogênese telítoca, onde somente fêmeas são geradas, foi descrita para as espécies *Silvestritermes minutus*, *Embiratermes neotenicus* (Syntermitinae), *Palmitermes impostor* e *Cavitermes tuberosus* (Termitinae) (FOUGEYROLLAS et al., 2015, 2017; FOURNIER et al., 2016; HELLEMANS et al., 2016). Já na subfamília Nasutitermitinae, os mecanismos reprodutivos também são variados, com descrição da ocorrência de reprodutores secundários, além de partenogênese e outros fenômenos, tais como fusão de colônias e pleometrose, onde múltiplos alados fundam o mesmo ninho (THORNE, 1982; STANSLY, 1987; MYLES, 1999; ADAMS et al., 2007). Ainda que a presente revisão tenha sido mais direcionada ao gênero *Nasutitermes*, a ocorrência de reprodutores neotênicos já foi descrita para outros gêneros desta subfamília, como

Atlantitermes (FONTES, 1979), *Lacessititermes* (ROONWAL, 1970), e *Constrictotermes* (CUNHA; BRANDÃO, 2002).

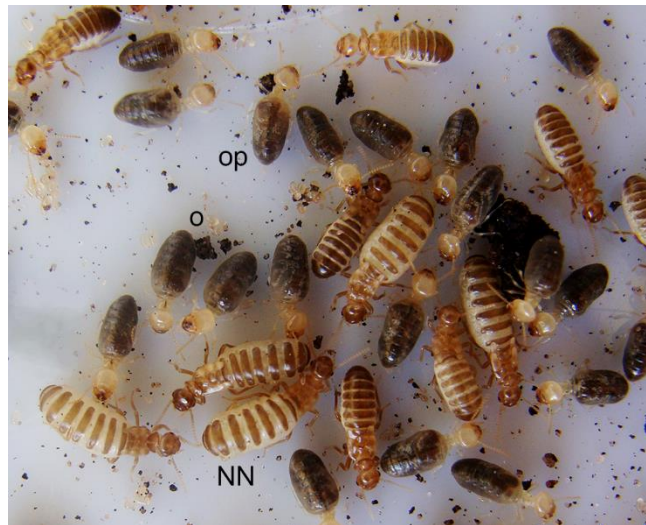


Figura 3. Detalhe dos reprodutores neotênicos ninfoides em *Silvestritermes euamignathus*, espécie de Syntermitinae que desenvolve estes reprodutores na ausência do casal real. NN = neotênicos ninfoides, o = ovos, op = operários. Foto: Ives Haifig.

2.2. O gênero *Nasutitermes*

Nasutitermes Dudley, 1890 compreende 257 espécies, sendo o gênero mais diverso dentre os Isoptera (KRISHNA et al., 2013). O cenário taxonômico do gênero é complexo, principalmente devido à problemas de identificação e má interpretação da literatura. Assim, a real diversidade de espécies ainda precisa ser objeto de estudo de futuras revisões taxonômicas (CONSTANTINO, 2002a). De acordo com Pearce (1994), *Nasutitermes* spp. são encontradas na maioria das regiões biogeográficas do planeta, adaptando-se à diferentes ambientes, incluindo florestas, campos abertos, monoculturas e ambientes urbanos (VASCONCELLOS; MOURA, 2010; CARVALHO; CARVALHO, 2012; ACDA, 2013; OLIVEIRA et al., 2013; SCHEFFRAHN et al., 2014). A diversificação de ambientes ocupados por espécies de *Nasutitermes* reflete na variedade de ninhos construídos, os quais podem ser arborícolas ou em montículos, na região Neotropical (COSARINSKY, 2005; LAFFONT, 2014).

Aproximadamente 78 espécies de *Nasutitermes* estão distribuídas na região Neotropical, as quais desempenham um importante papel na ciclagem de nutrientes, fixação de nitrogênio e produção de serapilheira (MARTIUS, 1994; VASCONCELLOS; MOURA, 2010). Outra importante função ecológica dos *Nasutitermes* é o abrigo de diversas espécies de invertebrados e vertebrados, os quais abrem cavidades nos ninhos, principalmente arborícolas, para se refugiarem (BRIGHTSMITH, 2000; DECHMANN et al., 2009; LISBOA et al., 2013).

Algumas espécies do gênero são classificadas como pragas na América do Sul (CONSTANTINO, 2002b), e nos Estados Unidos, onde *N. corniger* foi introduzido por acidente, causando severos danos estruturais e econômicos, os quais podem alcançar aproximadamente 10 milhões de dólares em prejuízos nos próximos anos (ALVAREZ, 2016).

2.3. Estratégias reprodutivas em *Nasutitermes*

O gênero *Nasutitermes* é o mais estudado do ponto de vista reprodutivo entre os Nasutitermitinae, incluindo análises de genética populacional e de estrutura reprodutiva em *Nasutitermes corniger* e *Nasutitermes nigriceps* (ATKINSON; ADAMS, 1997a, b; THOMPSON; HEBERT, 1998; ADAMS et al., 2007). No entanto, ainda que a maioria dos estudos sejam direcionados à *Nasutitermes*, informações referentes à biologia reprodutiva estão disponíveis para menos de 10% das espécies.

Em relação à ocorrência dos diferentes tipos de reprodutores, não há um padrão estabelecido entre as espécies de *Nasutitermes*, as quais apresentam tanto reprodutores primários, quanto o desenvolvimento de secundários, principalmente neotênicos ergatoides (Quadro 1). Em alguns representantes, como *Nasutitermes arborum* e *Nasutitermes exitiosus*, não há registros de reprodutores neotênicos, ainda que não seja possível atribuir esta ausência à problemas de amostragem ou a uma condição das espécies (MYLES, 1999). Por outro lado, a maioria das espécies estudadas possuem reprodutores secundários (Quadro 1), os quais se diferenciam na ausência de reprodutores primários ou durante a fundação de colônias satélites, comum em espécies arborícolas, caso de *N. corniger* (NUTTING, 1969; MYLES, 1999; THORNE et al., 1999). De acordo com Silva et al (dados não publicados), reprodutores neotênicos ergatoides e os adultoides são os mais frequentes entre as espécies de *Nasutitermes* estudadas, aparecendo em cerca de 37% destas.

Vale ressaltar a importância da identificação da origem dos reprodutores secundários para inferir quais castas estão associadas às atividades reprodutivas nas diferentes espécies. Ainda que características reprodutivas sejam manifestadas, como a fisogastria nas fêmeas e o próprio desenvolvimento do aparelho reprodutor, algumas características morfológicas das castas que precedem estes reprodutores secundários são mantidas. Nos reprodutores ninfoides, por exemplo, o desenvolvimento gradual de olhos e asas nas ninfas faz com que os reprodutores neotênicos ninfoides mantenham estas estruturas após sua diferenciação (COSTA-LEONARDO et al., 1999; MATSUURA, 2017). Nos reprodutores neotênicos ergatoides, os

quais se diferenciam de operários desprovidos de olhos e asas, tais estruturas normalmente não se manifestam (THORNE, 1984). No entanto, em algumas espécies de cupins, principalmente do gênero *Nasutitermes*, o surgimento de olhos e brotos alares durante o desenvolvimento de neotênicos ergatoides é comum, sugerindo que a maturação do aparelho reprodutor pode ativar genes associados ao desenvolvimento de características imaginais (NOIROT, 1985; MIURA, 2001) (Figura 6A-D). Em outros casos, a relação entre o desenvolvimento do aparelho reprodutor o surgimento de olhos é descartada, conforme observado em *Reticulitermes speratus* (MAEKAWA et al., 2008).

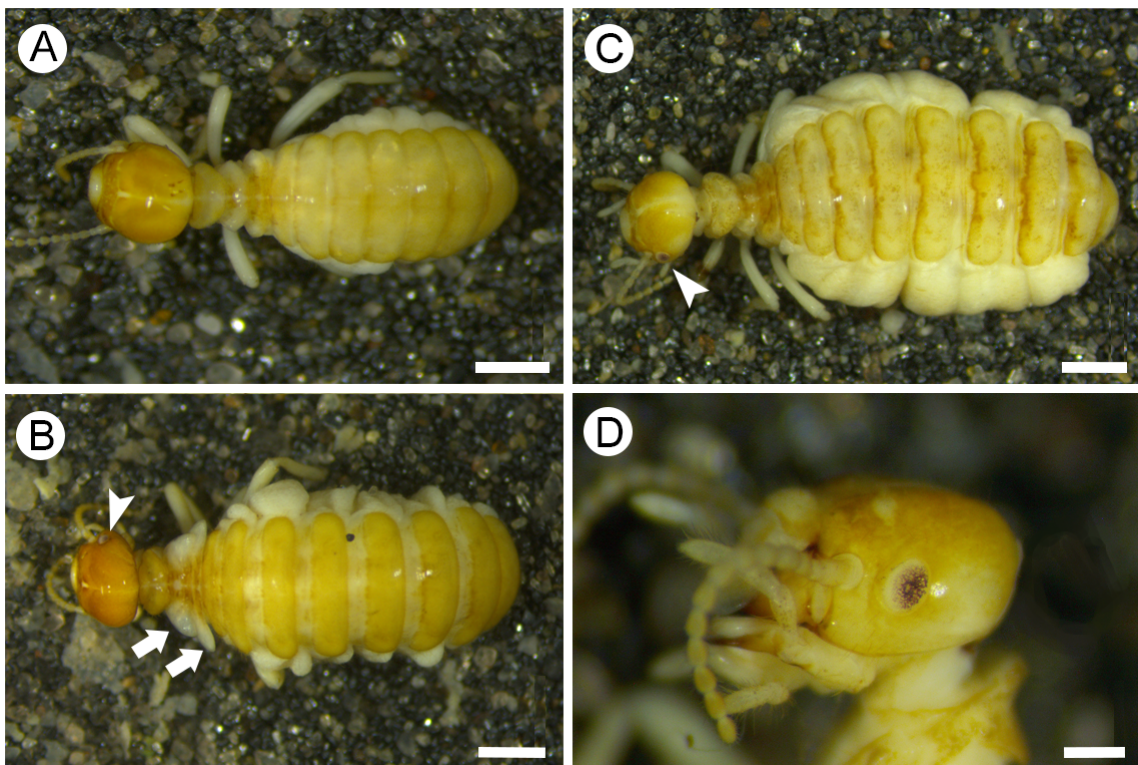


Figura 6. Reprodutores neotênicos ergatoides de *Nasutitermes aquilinus*. **A.** Fêmea ergatoide desprovida de características imaginais. **B. e C.** Fêmeas ergatoides com características imaginais, incluindo brotos alares (setas) e olhos (cabeças de seta). Observar o detalhe do olho (**D**). Escala: 1mm (A, B e C), 0,5mm (D). Foto: Iago Bueno da Silva.

2.4. Poliginia primária e reprodução secundária em *Nasutitermes* spp.

Em diversas espécies, incluindo *Nasutitermes* spp., a ocorrência de múltiplas rainhas em uma mesma colônia pode ser consequência de diferentes processos, tais como a fusão de colônias e a pleometrose (THORNE, 1982; ROISIN, 1993; ATKINSON; ADAMS, 1997a; MATSUURA; NISHIDA, 2001; ADAMS et al., 2007). No primeiro caso, reprodutores não aparentados compartilham o mesmo ninho, decorrente da fusão de colônias distintas. Durante este processo, as colônias podem ser receptivas ou não para com intrusos, fato que reflete no

sucesso desta fusão (WALLIS, 1964). Alguns fatores ambientais podem contribuir para a fusão de colônias, como eventos evolutivos do tipo “gargalo de garrafa”, os quais reduziram drasticamente a diversidade genética entre populações de *N. corniger*, causando erro na discriminação entre estas referidas populações (GARCIA et al., 2003). Em outras situações, a alta diversidade genética dentro da mesma colônia, e o conseqüente aumento na diversidade de sinais químicos, seriam as possíveis causas nos erros de reconhecimento entre indivíduos de diferentes colônias, facilitando a fusão das mesmas (REEVE, 1989).

A pleometrose é um fenômeno que ocorre logo após o voo nupcial, quando múltiplos reprodutores alados fundam o mesmo ninho e compartilham as tarefas reprodutivas. Este fenômeno pode estar associado a condições ambientais adversas, como a escassez de recursos, nas quais a fundação de uma colônia por mais de um casal de reprodutores é vantajosa (HACKER et al., 2005). A ocorrência de múltiplas rainhas primárias em *N. corniger* parece ser benéfica, para o crescimento populacional e da força de trabalho, visto que ninhos com múltiplas rainhas primárias crescem mais do que aqueles contendo um único casal (THORNE, 1982). No entanto, estudos recentes mostram que a pleometrose não é uma estratégia vantajosa, causando retardo tanto no desenvolvimento de colônias incipientes, quanto na produção de descendentes (HARTKE; ROSENGAUS, 2013). Ainda que *N. corniger* seja uma espécie que defende vigorosamente seu território contra intrusos (ADAMS; LEVINGS, 1987), o estabelecimento de colônias mistas é comum e também pode ser explicado pela falta de nepotismo entre operários, os quais prestam assistência de maneira igual para sua mãe e outras rainhas do ninho (ADAMS et al., 2007; ATKINSON et al., 2008).

A emergência simultânea de reprodutores secundários em *Nasutitermes* spp. é comum em colônias órfãs (MYLES, 1999) (Figura 7). Estes reprodutores podem contribuir de maneira conjunta, ainda que a fecundidade entre eles possa variar, impactando diretamente a capacidade das fêmeas de colocar ovos, por exemplo (NOIROT; THORNE, 1988; ATKINSON; ADAMS, 1997a). Em colônias de *Nasutitermes princeps* e *Nasutitermes novarumhebridarum*, a ausência do casal real é seguida do desenvolvimento de reprodutores adultoides e ergatoides, respectivamente, os quais botam ovos ativamente (ROISIN; PASTEELS, 1986; 1987). Na espécie Neotropical *Nasutitermes coxipoensis*, reprodutores secundários adultoides também são os que executam as tarefas reprodutivas após a morte do casal real e, em aproximadamente 20 semanas, as rainhas secundárias já apresentam fisogastria conspícua e postura de ovos (LEFEUVE, 1987). Fisogastria acentuada e produção de ovos também são características observadas em fêmeas ergatoides de *Nasutitermes guayanae* (denominada *Nasutitermes*

columbicus por NOIROT; THORNE, 1988). De fato, a maioria dos estudos reprodutivos, contemplando espécies do gênero *Nasutitermes*, se limitaram a descrições morfológicas, sem uma abordagem molecular para desvendar a estrutura reprodutiva das colônias e o impacto genético dos reprodutores secundários. Sendo assim, mais estudos são necessários, principalmente envolvendo espécies que desenvolvem reprodutores secundários na ausência do casal real.



Figura 7. Múltiplos reprodutores adultoides encontrados em um ninho de *Nasutitermes corniger*. Estes reprodutores se assemelham aos primários, visto que também derivam de imagos e possuem escama alar. Foto: Ana Maria Costa Leonardo.

2.5. Impacto genético dos reprodutores secundários

O uso de marcadores moleculares pode revelar estruturas reprodutivas variadas entre os Isoptera, incluindo colônias onde a ausência do casal real resulta na diferenciação de múltiplos reprodutores aparentados entre si (ATKINSON; ADAMS, 1997a; THOMPSON; HEBERT, 1998; ADAMS et al., 2007). Por outro lado, colônias de cupins com múltiplos reprodutores não aparentados foram identificadas com o auxílio de marcadores moleculares, sendo possível a classificação destas colônias como famílias mistas (ADAMS et al., 2007). A taxa de endogamia tende a aumentar em colônias formadas por múltiplos reprodutores aparentados. No entanto, a endogamia é maior ou menor dependendo do número de reprodutores e de quantas gerações são formadas por estes (VARGO; HUSSENER, 2009; 2010). Adicionalmente, ainda que em algumas vezes seja inviável amostrar os reprodutores de uma colônia de cupins, a análise genética dos descendentes possibilita uma avaliação da estrutura genética da colônia (VARGO; CARLSON, 2006; VARGO; HUSSENER, 2009; HAIFIG et al., 2016).

O uso de marcadores moleculares mitocondriais e nucleares em espécies do gênero *Nasutitermes* contribuem para elucidar a estrutura genética em algumas colônias. A técnica de “polimorfismo de conformação de fita dupla” (DSCP) e o uso de marcadores microssatélites foram aplicados em estudos genéticos com *N. corniger*, permitindo avanços no entendimento acerca da biologia reprodutiva da espécie (ATKINSON; ADAMS, 1997a, b; ADAMS et al., 2007). A metodologia DSCP permitiu identificar uma estrutura de família mista em cerca de 25% das colônias amostradas, devido à presença de mais de um haplótipo mitocondrial (ATKINSON; ADAMS, 1997a, b). Já os microssatélites permitiram identificar famílias estendidas e mistas, devido à quantidade e combinação dos alelos presentes nas colônias amostradas (ADAMS et al., 2007; ATKINSON et al., 2007). Outra espécie analisada utilizando marcadores moleculares foi *N. nigriceps*, na qual Thompson e Hebert (1998) constataram a ocorrência de famílias simples e estendidas em cerca de 5% dos ninhos desta espécie, por meio de aloenzimas polimórficas.

Quadro 1. Ocorrência de reprodutores secundários em diferentes espécies de *Nasutitermes*

Espécie	Região Zoogeográfica	Reprodutores secundários	Tipos de família (estudos moleculares)	Referências
<i>N. aquilinus</i>		Ergatoide	Simples/Estendida	Torales e Coronel (2006); Silva (observação pessoal)
<i>N. corniger</i>		Ergatoide/Ninfoide/ Adultoide	Simples/Estendida/ Mista	Atkinson e Adams (1997a); Adams et al (2007) Thorne e Noirot (1982); Roisin e Pasteels (1985) ¹
<i>N. coxipoensis</i>	Neotropical	Adultoide	-	Lefeuve (1987)
<i>N. ephratae</i>		Adultoide	-	Thorne (1982)
<i>N. guayanae</i>		Ergatoide		Noirot e Thorne (1988) ²
<i>N. nigriceps</i>		-	Simples/Estendida	Thompson e Hebert (1998)
<i>N. rippertii</i>		Adultoide	-	Andrews (1911) em Lefeuve (1987)
<i>N. arborum</i>		Adultoide	-	Noirot (1956)
<i>N. acutus</i>	Etiópica	Ninfoide	-	Kemner (1934) em Noirot (1956) ³
<i>N. latifrons</i>		-	-	Sjöstedt (1896) em Snyder (1949)
<i>N. ceylonicus</i>		Ergatoide/Adultoide	-	Kemner (1934) em Myles (1999)
<i>N. fuscipennis</i>		Ninfoide	-	Holmgren (1913) em Noirot (1956)
<i>N. matangensis</i>	Oriental	Ergatoide	-	Bathellier (1927) em Miura et al (2000)
<i>N. regularis</i>		Ergatoide	-	Holmgren (1913) em Snyder (1949)
<i>N. takasagoensis</i>		Ergatoide	-	Snyder (1949); Miura e Matsumoto (1996)
<i>N. dixonii</i>		Ninfoide	-	Snyder (1949); Gay e Calab (1970)
<i>N. exitiosus</i>	Australiana	Adultoide	-	Hill (1942)
<i>N. princeps</i>	Australiana/Papuana	Adultoide	-	Holmgren (1913) em Noirot (1956); Roisin e Pasteels (1986)
<i>N. novarumhebridarum</i>	Papuana	Ergatoide	-	Roisin e Pasteels (1987)

¹ Identificado como *N. polygynus* e *N. costalis*² Identificado como *N. columbicus*³ Noirot (1956) comenta que indivíduos ergatoides podem desenvolver características de ninfoides

2.6. Mecanismos reprodutivos e potencial praga em *Nasutitermes* spp.

Diferentes espécies do gênero *Nasutitermes* são classificadas como pragas de interesse econômico tanto em áreas urbanas quanto agrícolas (CONSTANTINO, 2002b). Por exemplo, *N. corniger* foi introduzido acidentalmente nos Estados Unidos, provavelmente através do transporte de madeira infestada, e se tornou responsável por severos danos estruturais e impactos ecológicos negativos no estado da Flórida (SCHEFFRAHN et al., 2002; 2014). Na América do Sul, existem registros de alguns cupins nativos do gênero *Nasutitermes* como pragas. Este é o caso de *Nasutitermes aquilinus*, o qual infesta plantações de eucalipto, ou o próprio *N. corniger*, responsável pela infestação de árvores frutíferas (BANDEIRA, 1998; TORALES, 1998). No Brasil, esta espécie é considerada praga urbana em algumas regiões (BANDEIRA et al., 1989; BANDEIRA, 1998; FONTES; MILANO, 2002). De acordo com Bandeira (1998), espécies do gênero *Nasutitermes* são responsáveis por mais de 50% dos danos estruturais causados em edifícios na cidade de Belém-PA, alimentando-se de diferentes tipos de madeira. Adicionalmente, em áreas rurais, infestações em culturas de café e milho também já foram relatadas (SILVA et al., 1968; MILL, 1992). Na Amazônia, espécies arbóreas, tais como o Aracari (*Macarobium acaciifolium*), o Inhamuí (*Ocotea cymbarum*) e a Muiratinga (*Maquira coriacea*), são frequentemente atacadas por cupins das espécies nativas *Nasutitermes surinamensis* e *Nasutitermes macrocephalus* (ABREU; SILVA, 2000).

As estratégias reprodutivas adotadas por uma espécie com potencial praga têm um importante papel na longevidade das colônias, impactando o sucesso e a agressividade da infestação. Ninhos poligínicos de *N. corniger* são maiores quando comparados àqueles com um único casal de reprodutores, resultado de um crescimento populacional maior e de uma intensificação na força tarefa da colônia (THORNE, 1982). Em *N. guayanae*, ainda que as colônias normalmente sejam portadoras de reprodutores primários, centenas de reprodutores ergatoides já foram amostrados em ninhos órfãos (NOIROT; THORNE, 1988). De acordo com os mesmos autores, estes neotênicos ergatoides eram reprodutivamente ativos, com fêmeas apresentando postura regular de ovos e espermatozoides em suas espermatecas.

2.7. A espécie *Nasutitermes aquilinus*

A espécie de cupim neotropical *Nasutitermes aquilinus* (Holmgren, 1910), foco principal deste estudo, é encontrada em áreas florestais tropicais, onde constrói ninhos arborícolas. *N. aquilinus* está distribuída especificamente nas regiões tropical e subtropical do Sudeste da América do Sul, incluindo o Brasil, Argentina e Paraguai (TORALES et al., 1997),

onde há registros de construção de ninhos desta espécie em diferentes espécies arbóreas (COSARINSKY, 2005). Assim como outras espécies do gênero, *N. aquilinus* apresenta operários com dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos. Devido a isto, reprodutores neotênicos ergatoides machos e fêmeas apresentaram tamanhos diferentes (TORALES; CORONEL, 2006). De acordo com Torales e Coronel (2006), reprodutores ergatoides em *N. aquilinus* não são raros, ocorrendo em aproximadamente 20% das colônias estudadas. O desenvolvimento destes reprodutores pode ter um impacto positivo no crescimento populacional e no potencial de infestação da espécie, considerada praga oportunista (FONTES; MILANO, 2002) e frequentemente amostrada em culturas de eucalipto (SILVA, observação pessoal).

Uma grande quantidade de reprodutores ergatoides já foi encontrada em ninhos de *N. aquilinus* (TORALES; CORONEL, 2006; TSANTARLIS, 2015) e, ainda que sua ocorrência também tenha sido reportada em outras espécies do gênero (THORNE; NOIROT, 1982; ROISIN; PASTEELS, 1987; NOIROT; THORNE, 1988; MIURA; MATSUMOTO, 1996), a maioria dos trabalhos se limitou a descrição morfológica destes indivíduos (NOIROT; THORNE, 1988; TORALES; CORONEL, 2006; TSANTARLIS, 2015). Sendo assim, não há informações acerca da influência dos reprodutores ergatoides na estrutura genética de colônias de *Nasutitermes*, nem dados relacionados aos tipos de família nas quais colônias de *N. aquilinus* são classificadas.

3. Objetivos gerais

O objetivo deste estudo foi compreender as estratégias reprodutivas da espécie *Nasutitermes aquilinus*, dando ênfase para a diferenciação e influência de reprodutores neotênicos ergatoides na colônia. Para tanto, as seguintes questões foram levantadas:

- De que forma os reprodutores neotênicos ergatoides de *N. aquilinus* contribuem para a dinâmica populacional da colônia? A formação destes ergatoides tem influência na produção de alguma casta específica em colônias de *N. aquilinus*?
- Qual é o potencial reprodutivo dos reprodutores neotênicos ergatoides presentes em ninhos de *N. aquilinus*?
- Quais são os mecanismos envolvidos na reprodução de *N. aquilinus* e em qual classificação suas colônias se encaixam: famílias simples, estendidas ou mistas?

4. Material e Métodos

4.1. Cupins: Onze ninhos da espécie *Nasutitermes aquilinus* (Holmgren, 1910) foram coletados em Rio Claro, SP (22° 24' 43.9"S 47° 36' 34.0"W), São Carlos, SP (21° 59' 26.7"S 47° 52' 58.3"W) e Corumbataí, SP (22° 13' 26.2"S 47° 38' 26.1"W). Todos os ninhos foram levados para o Laboratório de Cupins da Unesp de Rio Claro, onde foram abertos e as castas amostradas (Figura 8/ Quadro 2). Fêmeas ergatoides foram amostradas nos ninhos N2, N6 e N11. A distância entre os ninhos N2 (Rio Claro) e N6 (São Carlos) era de 26km, enquanto a distância do ninho N2 para o ninho N11 era de aproximadamente 5m.

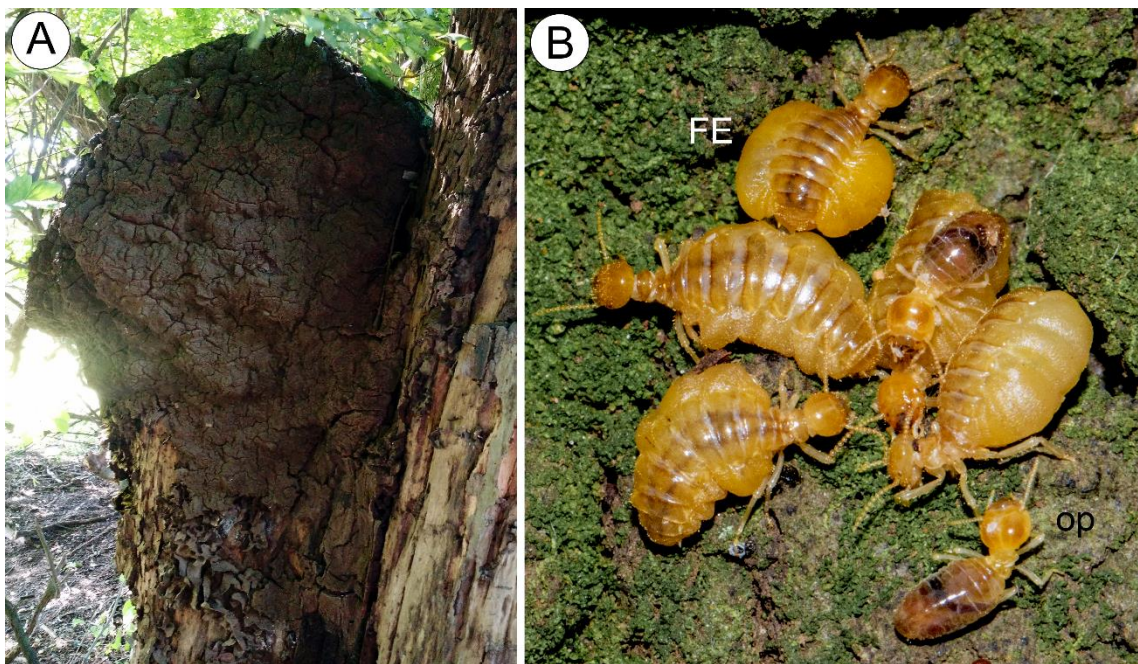


Figura 8A. Ninho de *Nasutitermes aquilinus*. **B.** Fêmeas neotênicas ergatoides e operários de *N. aquilinus*. FE = fêmeas ergatoides, op = operário. Fotos: Iago Bueno da Silva.

Quadro 2. Ninhos coletados, tipos de reprodutores encontrados e castas genotipadas

Ninhos	Local de coleta	Reprodutores neotênicos	Outras castas/ ovos
N1	Corumbataí/SP	-	larvas*, operários (9) e soldados (8)
N2	Rio Claro/SP	fêmeas ergatoides (14)	larvas*, operários (15), soldados (16)/ ovos* (>100)
N3	Rio Claro/SP	-	operários (12), soldados (13) e ninfas (10)
N4	Rio Claro/SP	-	operários (7) e soldados (4)
N5	São Carlos/SP	-	operários (10), soldados (8) e ninfas (8)
N6	São Carlos/SP	fêmeas ergatoides (25)	larvas*, operários (8), soldados (12) e ninfas (7)
N7	São Carlos/SP	-	operários (7) e soldados (10)
N8	São Carlos/SP	-	operários (5) e soldados (6)
N9	São Carlos/SP	-	operários (6) e soldados (7)
N10	São Carlos/SP	-	operários (5) e soldados (9)
N11	Rio Claro/SP	fêmeas ergatoides (4)	Operários (6) e soldados (7)

- = reprodutores ausentes

Os números entre parênteses referem-se à quantidade de indivíduos amostrados por casta.

* Amostras não submetidas a análises moleculares

4.2. Morfologia externa e morfometria dos reprodutores: Fêmeas ergatoides coletadas nos ninhos N6 e N11 foram utilizadas nesta etapa, sendo que os parâmetros de morfologia externa considerados foram: presença de olhos e brotos alares. Na presença de brotos alares, o comprimento do broto anterior direito foi medido. A avaliação da fisogastria foi estimada através do cálculo do volume do abdômen, seguindo os métodos propostos por Roisin e Pasteels (1986) e Costa-Leonardo et al (1998), considerando a largura do quarto tergito e o comprimento entre o primeiro e o sétimo tergito. O peso fresco das fêmeas ergatoides do ninho N11 foi quantificado utilizando uma balança de precisão A&D HR-200. Todas as observações morfológicas e medidas foram realizadas com auxílio de um estereomicroscópio Zeiss Discovery V8, por meio do software ZEN 2. Uma correlação entre comprimento do broto alar anterior direito e volume abdominal foi conduzida entre todas as fêmeas. Para tanto, as amostras

foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk para normalidade e posterior correlação de Pearson. Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software R v3.0.2, (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

4.3. Histologia: Para avaliar o estágio de desenvolvimento e maturação do sistema reprodutor, seis fêmeas ergatoides foram submetidas a histologia, sendo quatro provenientes do ninho N6 e duas do ninho N11. Para tanto, abdomens de fêmeas ergatoides foram fixados em FAA (Formaldeído 40%, Ácido acético glacial, Álcool absoluto, 1:1:3) durante 24 horas e, posteriormente, desidratados em uma bateria crescente de etanol (70% a 95%) tendo, cada banho, 45 minutos de duração. As amostras foram transferidas para solução de resina de infiltração (Leica) e mantidas em geladeira por 7 dias. Os abdomens foram posicionados verticalmente em historesina (Leica), juntamente com catalisador, para polimerização em estufa a 37°C. Secções de 3µm foram obtidas em micrótomo Leica RM2245, colocadas em lâminas de vidro e coradas com azul de toluidina/fucsina. As lâminas foram fotografadas com auxílio de microscópios Leica ICC50 e Zeiss Axioskop 50. A classificação dos ovócitos foi realizada de acordo com Grandi et al (1988).

4.4. Análises genéticas: Para quantificar a diversidade genética das colônias e estabelecer a origem e parentesco entre neotênicos ergatoides, marcadores mitocondriais e de microssatélites foram utilizados. O DNA total de 43 neotênicas ergatoides e 215 imaturos (operários, soldados e ninfas) foi extraído da cabeça e do tórax destes indivíduos, utilizando kits para extração (Wizard Genomics - PROMEGA). As amostras obtidas foram diluídas em H₂O Milli-Q até atingirem a concentração de 10µg/ml, e estocadas a -4 °C.

4.4.1. Seleção de primers: Treze primers foram desenhados exclusivamente para *N. aquilinus*. Para tanto, uma amostra de DNA obtida a partir de um pool de 7 operários foi sequenciada utilizando o sequenciamento de alta precisão MiSeq V3 (Illumina®). As sequências (“reads”) obtidas foram organizadas em *contigs* utilizando o programa SparseAssembler. As *contigs* foram analisadas para a presença de microssatélites no programa Msatcommander®. Após este procedimento, foram selecionadas 118 regiões contendo microssatélites com repetições de trinucleotídeos, para as quais foram desenhados 13 pares de *primers* no programa Primer 3. A otimização dos marcadores mostrou que somente um marcador (Na2296) era viável para conduzir as análises genéticas pretendidas. Para aumentar a quantidade de marcadores utilizados no estudo, oito loci de microssatélites de *Nasutitermes corniger* (ATKINSON et al.,

2007), oito de *Velocitermes heteropterus* (LIMA et al., 2013) e 12 de *Silvestritermes euamignathus* (HAIFIG et al., 2016) foram testados com amostras de DNA de operários de *N. aquilinus*. No total, além do locus Na2296, mais quatro loci se mostraram polimórficos para a condução do estudo (Quadro 3).

Quadro 3. Primers desenhados para loci de microssatélites e selecionados para análises com *Nasutitermes aquilinus*.

Loci	Primers	Repetições	Ta (°C)	Fonte
Ncor3	F: GATCACTGTTGGTTCAAGAGA R: ATGATACACCCAAATGAAATG	(TAA) ₂₆	55	Atkinson et al (2007)
Na2296	F: ACACCCCTCTATCCGCAAAA R: AGGTGAAAGAACAGGCCCTT	(ATT) ₂₀	53,4	presente estudo
Vh19-1	F: ACTATTCCAGTGGCTCCAA R: GGCTTCACATCTCCCAAT	(ATT) ₁₂	59	Lima et al (2013)
Vh22-1	F: GCAAACATGACCACAAGCAG R: GGTCACCCCTTCTGTATCGAAT	(ATT) ₄	59	Lima et al (2013)
Se5	F: ACTGAACGAGTTGTCTGCAA R: GGTTCCTTCCATGACCACCA	(ATC) ₈	55	Haifig et al (2016)

F: forward; R: reverse; Ta – temperatura de anelamento em °C.

4.4.2. Ampliação por PCR: O DNA das amostras foi submetido a reações em cadeia da polimerase (PCRs) para amplificação dos loci de microssatélites. O volume total de cada reação de PCR foi de 12 µL, contendo DNA 10µg/ml, H₂O Milli-Q, dNTPs 5mM, Taq polymerase 5U/µL, primer Reverse 100µM, primer Forward 100µM (com marcador M13), MgCl₂ 0,5 Mm e tampão NH₄ 10XPCR. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1% para verificar se o tamanho do amplicon era condizente com o esperado a partir da sequência pela qual o marcador foi desenhado.

Para os primers marcados com M13 (Na2296, Vh19-1, Vh22-1, Se5), o programa de PCR seguiu as seguintes etapas: 95°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, T°C de anelamento específica para cada primer por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; 72°C por 3 minutos e 4°C por tempo indeterminado. Para o primer Ncor3, o qual não possuía marcação com M13, o programa de PCR seguiu as seguintes etapas: 95°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 35 segundos e 72°C por 30 segundos; 12 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos; 72°C por 20 minutos e 4°C por tempo indeterminado. Para as reações de PCR utilizando primers de Ncor3, o fluóforo FAM 10pmol foi adicionado.

4.4.3. Genotipagem: Os produtos da PCR foram analisados em ABI 3500 Genetic Analyzer. Para tanto, as reações foram desnaturadas com formamida Hi-Di™ a 95°C por 5 minutos. A detecção dos alelos foi feita por eletroforese capilar, originando gráficos com picos de luminescência e possibilitando a genotipagem. Os alelos foram detectados e quantificados utilizando o software Geneious (Biomatters Limited). As análises estatísticas foram conduzidas com o pacote FSTAT (GOUDET, 2002), estimando *F-statistics* e o índice de parentesco dentro das colônias.

4.4.4. Sequenciamento e identificação de haplótipos mitocondriais: Amostras de DNA de 43 fêmeas ergatoides provenientes de três ninhos (N2, N6 e N11) foram utilizadas para identificar os haplótipos maternos nestas reprodutoras. O DNA foi amplificado utilizando um par de primers para o gene mitocondrial COI em reações de PCR (Forward: ATGGCAGATTAGTGCAATGG; Reverse: GTTTAAGAGACCAGTACTTG), as quais continham um volume total de 15µL, contendo DNA 15µg/ml, H₂O Milli-Q, dNTPs 5mM, Taq polymerase 5U/µL, primer Reverse 100µM, primer Forward 100µM, MgCl₂ 0,5 Mm e tampão NH₄ 10XPCR. O programa de PCR utilizou as seguintes etapas: 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 45°C por 1,30 minutos e 72°C por 2 minutos; 72°C por 5 minutos e 4°C por tempo indeterminado. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1% para identificação de bandas de amplicon, purificado utilizando o reagente ExoSAP-IT™ e submetido a um sequenciamento padrão (Macrogen Inc). As sequências obtidas foram editadas e alinhadas utilizando o software Geneious (Biomatters Limited), de modo a identificar o número de haplótipos mitocondriais compartilhados pelas fêmeas neotênicas ergatoides.

5. Resultados

5.1. Morfologia externa e morfometria dos reprodutores: As fêmeas neotênicas ergatoides, amostradas nos ninhos N6 e N11, apresentaram variação nas características imaginais, como presença e ausência de brotos alares e olhos (Figura 9).

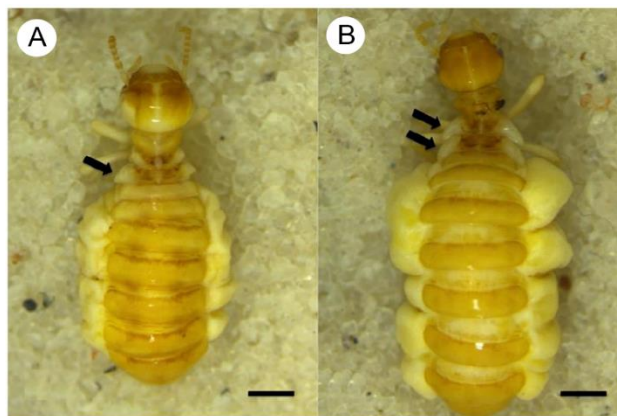


Figura 9A. Fêmeas ergatoides coletadas do ninho N6 de *Nasutitermes aquilinus*. **A.** Fêmea ergatoide com fisogastria menos desenvolvida. **B.** Fêmea ergatoide com fisogastria conspícua. Características imaginais, tais como olhos e brotos alares (setas) ocorrem em reprodutores ergatoides. Escala = 1mm. Fotos: Iago Bueno da Silva.

A fisogastria também variou entre as neotênicas ergatoides coletadas nos ninhos N6 e N11 (Figura 10). As amostras do ninho 11 apresentaram, em média, maior volume abdominal em comparação com as fêmeas do ninho N6 ($\bar{x} = 20.05$ e $\bar{x} = 12.9$, respectivamente). Uma menor variação na fisogastria também foi observada entre fêmeas ergatoides do ninho 11 em relação àquela encontrada entre fêmeas ergatoides do ninho N6 (Figura 10).

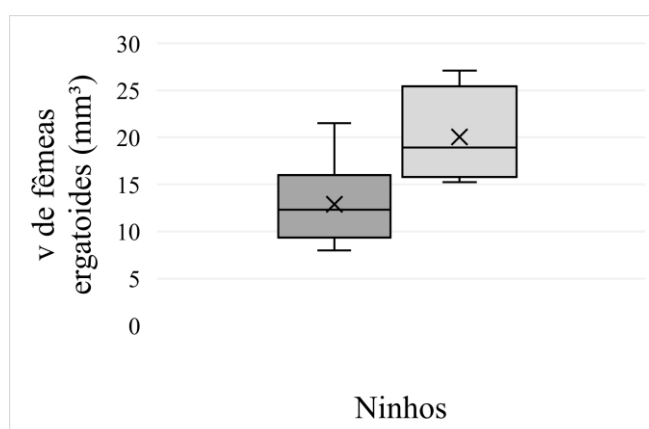


Figura 10. Variação da fisogastria entre fêmeas ergatoides de *N. aquilinus* dos ninhos N6 e N11. v = volume abdominal, cinza escuro = amostrados do ninho N6, cinza claro = amostras do ninho N11.

A tabela 1 compila os dados morfológicos e morfométricos encontrados em fêmeas ergatoides dos ninhos N6 e N11. De acordo com o teste de Pearson empregado com as medidas do broto alar anterior direito e volume abdominal, houve uma correlação moderada entre estas características nas 25 fêmeas analisadas no ninho N6 ($r=0.6528$, $p<0.05$, $gl=23$). Desta forma, é sugerido que a maturação das estruturas reprodutivas, caracterizada pelo desenvolvimento da fisogastría, está significativamente associado ao surgimento de características imaginais nestas fêmeas (Figura 11). No entanto, não houve correlação entre as características imaginais e o desenvolvimento abdominal entre fêmeas do ninho N11, principalmente devido ao fato de que algumas fêmeas não possuíam brotos alares, mesmo apresentando fisogastría acentuada ($p>0.05$).

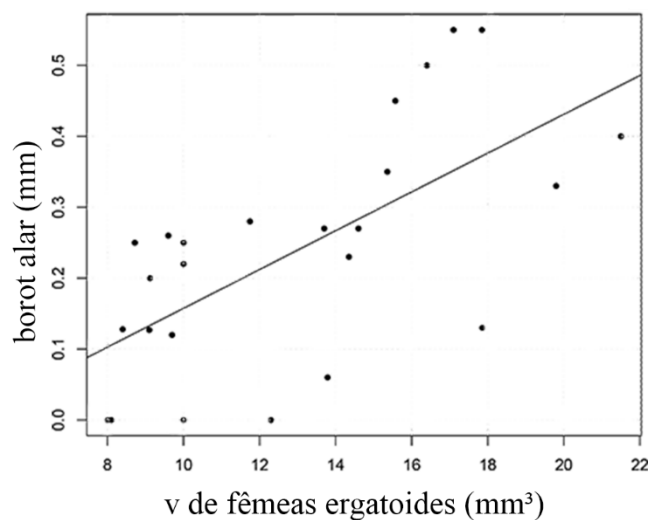


Figura 11. Correlação entre comprimento do broto alar anterior direito e fisogastría em fêmeas ergatoides coletadas no ninho N6.

Tabela 1: Características morfológicas e morfométricas das fêmeas neotênicas ergatoides amostrados nos ninhos N6 e N11

Ergatoide	Ninho	Comprimento do abdômen (mm)	Volume abdominal (mm ³)/ peso (mg)	Comprimento do broto alar anterior direito (mm)	Largura da cabeça (mm)	Presença de olhos
1	N6	4.60	16.4	0.50	1.25	-
2	N6	4.05	15.36	0.35	1.30	-
3	N6	4.25	17.86	0.13	1.35	+
4	N6	5.28	21.5	0.4	1.30	+
5	N6	4.25	17.1	0.55	1.28	+
6	N6	3.15	11.75	0.28	1.29	+
7	N6	4.48	14.6	0.27	1.24	+
8	N6	4.3	14.35	0.23	1.26	+
9	N6	3.25	9.1	0.127	1.25	+
10	N6	3.10	8.0	-	1.30	-
11	N6	5.15	17.85	0.55	1.29	+
12	N6	3.35	8.4	0.128	1.28	-
13	N6	5.0	19.8	0.33	1.35	+
14	N6	3.55	13.7	0.27	1.35	+
15	N6	4.20	9.6	0.26	1.25	-
16	N6	3.0	10.0	0.22	1.26	+
17	N6	3.1	10.0	-	1.30	-
18	N6	3.7	12.3	-	1.29	+
19	N6	3.12	9.7	0.12	1.38	-
20	N6	2.85	8.1	-	1.28	+
21	N6	3.95	15.57	0.45	1.25	-
22	N6	3.1	8.72	0.25	1.30	+
23	N6	4.25	13.79	0.06	1.27	+
24	N6	3.25	10.0	0.25	1.25	+
25	N6	3.6	9.12	0.20	1.26	-
26	N11	5.12	15.24/ 35.8	-	1.25	+
27	N11	5.18	20.34/ 36.6	-	1.25	+
28	N11	6.8	27.12/ 39.8	0.13	1.30	+
29	N11	4.5	17.5/ 26.8	-	1.27	+

- = ausente, + = presente

5.2. Histologia: Nas fêmeas neotênicas ergatoides de *N. aquilinus*, assim como em outras espécies de cupins, o aparelho reprodutor é composto por dois ovários, dois ovidutos, câmara genital, espermateca e glândulas acessórias. Cada ovário consiste de diversos ovaríolos panoísticos com ovócitos que iniciam seu desenvolvimento no ápice e, progressivamente, atingem estágios finais de maturação, caracterizado pela deposição de vitelo. A partir das análises histológicas, foi possível observar ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento presentes em fêmeas neotênicas ergatoides de *N. aquilinus*. De acordo com a classificação de Grandi et al (1988), foram verificados três estágios de ovócitos localizados no ápice dos ovários, classificados como pré-vitelogênicos, e três mais basais, classificados como vitelogênicos.

Ovócitos pré-vitelogênicos: Ovócitos no estágio I de desenvolvimento apresentaram uma camada de células foliculares bastante achatadas, dispostas em uma única camada (Figura 12A). Além disso, os ovócitos apresentavam núcleos e nucléolos proeminentes e ausência de vitelo. Ovócitos no estágio II foram caracterizados por um envoltório de epitélio folicular constituído por células cúbicas (Figura 12B). O núcleo se dispõe na região central e há ausência de vitelo. Os ovócitos de estágio III eram maiores que os anteriores, e apresentaram um epitélio folicular constituído por células colunares (Figura 12C).

Ovócitos vitelogênicos: Os ovócitos de estágio IV foram caracterizados pela presença de um epitélio folicular também constituído por células colunares. Contudo, um início de deposição de vitelo foi observado nestes ovócitos, e a vesícula germinativa mostrou-se bastante evidente ao redor do núcleo (Figura 12D). Estes ovócitos apresentaram menor quantidade de vitelo se comparado àqueles dos estágios V e VI. No estágio V, o segundo vitelogênico, os ovócitos apresentaram folículo celular constituído por células cúbicas (Figura 12E). Os ovócitos de estágio VI são também denominados terminais, possuíam grande quantidade de vitelo e mostraram maior tamanho. Adicionalmente, um epitélio folicular bastante achatado de células escamosas estava disposto ao redor destes ovócitos (Figura 12F).

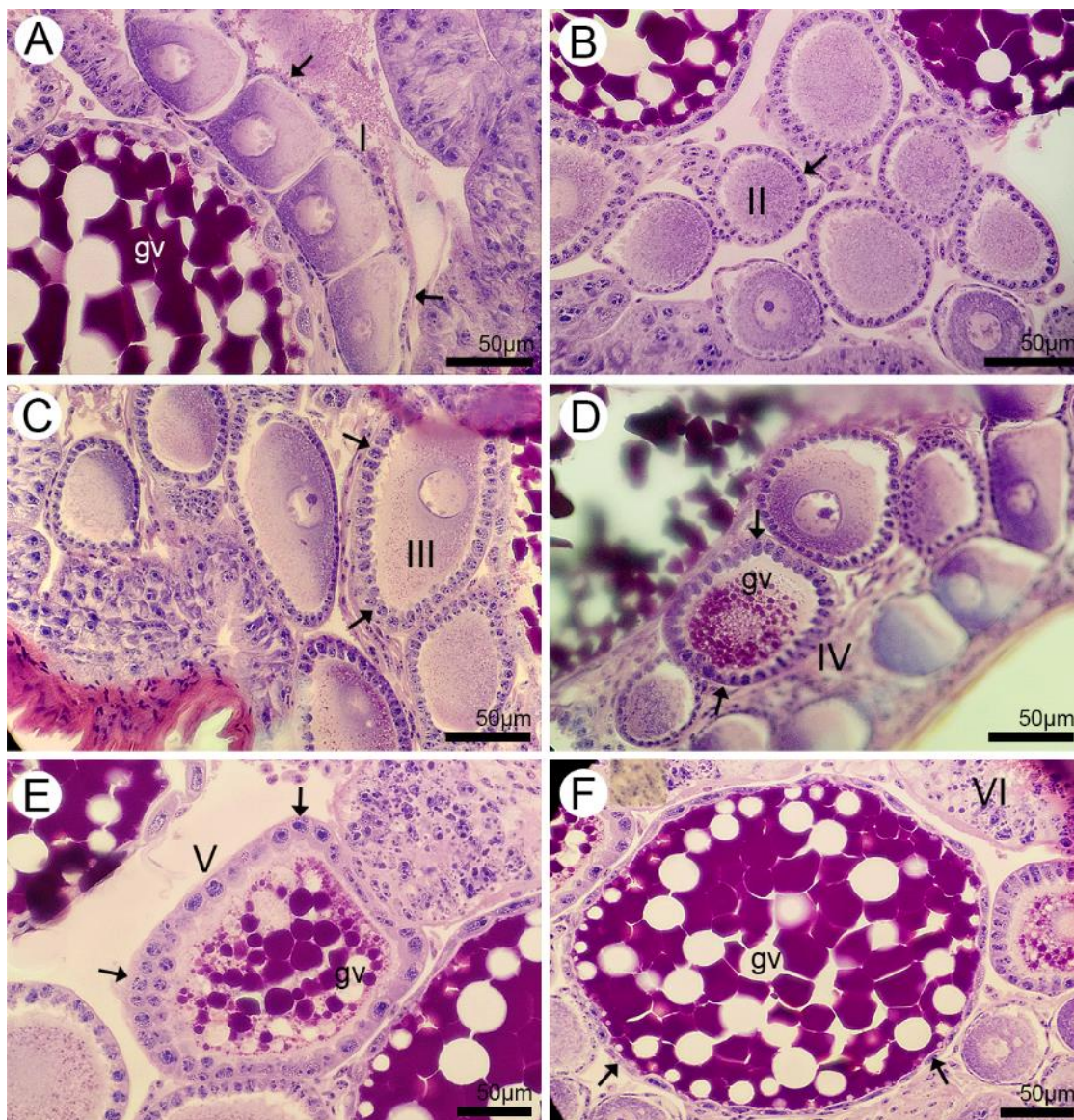


Figura 12. Histologia dos ovócitos da fêmea ergatoide 4 do ninho 6 de *N. aquilinus*. **A.** Secção transversal de ovócitos de estágio I e parte de um ovócito vitelogênico terminal. **B.** Secção transversal de ovócitos de estágio II com epitélio cúbico de células foliculares. **C.** Secção longitudinal de um ovócito de estágio III com epitélio colunar de células foliculares. **D.** Secção transversal de um ovócito de estágio IV, no qual é possível observar o início da deposição de vitelo. **E.** Secção longitudinal de um ovócito de estágio V, caracterizado pelo conteúdo de vitelo e epitélio folicular cúbico. **F.** Secção transversal de um ovócito de estágio VI (terminal) com epitélio escamoso de células foliculares. Setas = epitélios foliculares, gv = grânulos de vitelo. Coloração: Azul de toluidina/fucsina. Fotos: Iago Bueno da Silva.

As secções histológicas da espermateca indicaram a presença de diversos espermatozoides esféricos e aflagelados no lúmen desta estrutura (Figura 13A). Além disso, destacou-se a presença de corpo gorduroso real, tecido característico de rainhas fisogástricas, uma vez que outras castas possuem corpo gorduroso normal (Figura 13B) (Quadro 4).

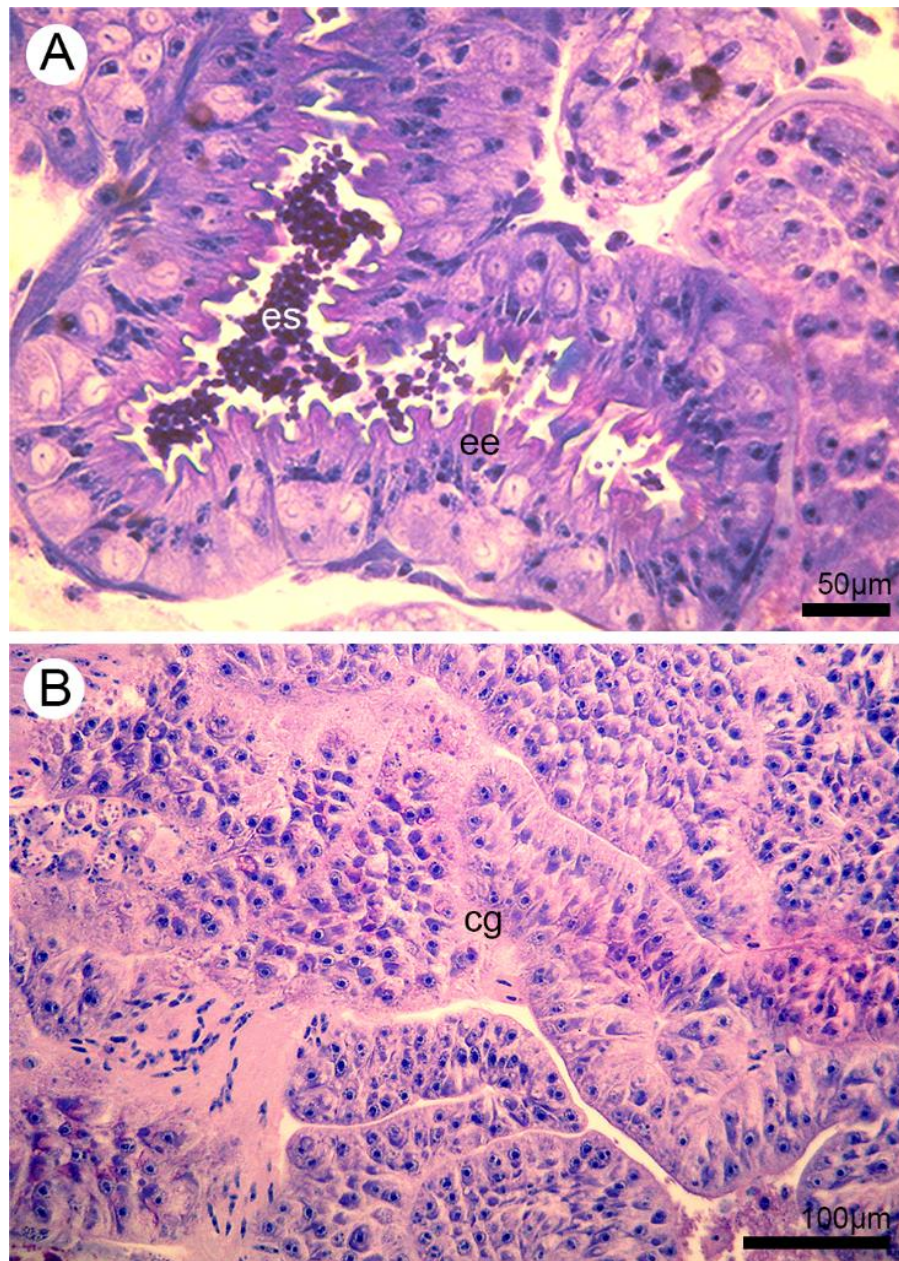


Figura 13A. Secção transversal da espermateca da fêmea ergatoide 2 do ninho 6 de *N. aquilinus*. É possível observar muitos espermatozoides esféricos e aflagelados no lúmen da espermateca. **B.** Corpo gorduroso real característico de rainhas. ee = epitélio da espermateca, es = espermatozoides, cg = corpo gorduroso real. Coloração: Azul de toluidina/fucsina. Fotos: Iago Bueno da Silva.

Quadro 4. Características das fêmeas ergatoides de *N. aquilinus* do ninho 6.

Fêmeas ergatoides	Ninho	Espermateca	Ovócitos vitelogênicos terminais	Corpo gorduroso real
1	N6	não observada	4	+
2	N6	com espermatozoides	12	+
3	N6	com espermatozoides	2	+
4	N6	não observada	16	+
5	N11	não observada	20	+
6	N11	com espermatozoides	17	+

N = ninho, E = ergatoides, + = presente, - = ausente

5.3. Genotipagem: De acordo com a genotipagem das amostras, cada colônia estudada apresentou um máximo de quatro alelos por locus, limitando a possibilidade de fusão de colônias ou fundação de colônias por múltiplos reprodutores não aparentados. A quantidade de alelos presentes por locus de microssatélites variou de dois a seis, sendo a maior variação encontrada no marcador Ncor3, com seis alelos distribuídos entre as 11 colônias amostradas (Quadro 5). Com exceção de N2, N3 e N6, todas as colônias apresentaram de um a quatro genótipos, sugerindo que estas colônias foram fundadas por somente um casal de reprodutores, os quais atuam de forma exclusiva na reprodução. Nas colônias N2, N3 e N6, a quantidade de genótipos variou de um a seis, sugerindo a possível formação de famílias estendidas, ou seja, nas quais parte da prole é proveniente de reprodutores secundários. Os quadros A1-A11, apresentadas como anexos, listam todos os alelos encontrados para os loci de microssatélites nos diferentes ninhos de *N. aquilinus*. Ainda que a distribuição dos genótipos fosse compatível com a formação de famílias simples e estendidas, a diversidade de alelos mostrou-se baixa (Quadro 5).

De uma forma geral, as colônias estudadas mostraram baixo índice de endogamia ($F_{IT} = -0.312 \pm 0.192$), e diferenciação genética moderada entre si ($F_{ST} = 0.164 \pm 0.069$). Em relação a seus companheiros de ninhos, indivíduos de *N. aquilinus* apresentaram baixo índice de endogamia ($F_{IS} = -0.578 \pm 0.104$), sugerindo uma baixa atividade reprodutiva entre indivíduos aparentados. O índice de parentesco encontrado entre companheiros de ninhos indicou que os mesmos eram provenientes de uma única linhagem parental ($r = 0.496 \pm 0.080$). Na colônia N11, a qual apresentou fêmeas neotênicas ergatoides e possuía até quatro genótipos entre os

loci de microssatélites, os companheiros de ninhos apresentaram diversidade genética moderada entre si ($F_{IS} = -0.546$). Nas colônias N2 e N6 (com ergatoides amostrados) e N3 (sem ergatoides amostrados), as quais apresentaram mais de quatro genótipos entre os loci, o índice F_{IS} foi de -0.474, -0.549 e -0.530, respectivamente, indicando valores baixos para endogamia.

Quadro 5. Quantidade de alelos amostrados em diferentes colônias de *N. aquilinus* para os diferentes marcadores microssatélites selecionados.

Ninho Locus	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	Total*
Ncor3	3	4	4	3	3	2	3	3	2	2	2	6
Vh19-1	3	4	2	2	2	4	3	3	3	3	3	4
Vh22-1	3	3	3	2	2	3	2	2	2	2	2	3
Na2296	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Se5	2	2	1	2	1	2	1	1	1	1	2	2

* Referente à diversidade alélica observada em todas as colônias.

5.4. Sequenciamento e identificação de haplótipos mitocondriais: O sequenciamento do gene COI evidenciou dois haplótipos mitocondriais em fêmeas ergatoides de *N. aquilinus*. As mutações ocorreram em duas regiões do gene, conforme indicado no Quadro 6. O haplótipo 1 ocorreu nas colônias N2 e N6, enquanto o haplótipo 2 foi exclusivo das amostras provenientes da colônia N11. Somente um haplótipo foi encontrado por colônia, indicando que todas as fêmeas ergatoides de um mesmo ninho compartilhavam a mesma origem materna. A presença de um único haplótipo materno na colônia N2, juntamente com genótipos inconsistentes para a monogamia, sustenta a classificação desta colônia como uma família estendida. O alinhamento das amostras, executado com auxílio do software Geneious, consta nos anexos (Figura A1).

Quadro 6. Haplótipos do gene COI compartilhados entre reprodutoras neotênicas ergatoides de *N. aquilinus*. Os números entre parênteses são referentes à quantidade de indivíduos amostrados por colônia.

Colônia	Posição do par de base alterado	
	334	819
N2 (14)	T	A
N6 (25)	T	A
N11 (4)	A	G

6. Discussão

Os presentes resultados mostram a ocorrência de reprodutores neotênicos ergatoides com diferentes graus de fisogastria em colônias de *N. aquilinus*. Entre os reprodutores secundários, os ergatoides são os menos frequentes, principalmente entre os Termitidae (MYLES, 1999; ROISIN; KORB, 2010). O desenvolvimento destes reprodutores parece ser facilitado em épocas em que as colônias não possuem nem ninfas e nem imagos, uma vez que estes neotênicos, derivados de operários são rapidamente substituídos por neotênicos ninfoides (ROISIN, 1990; COSTA-LEONARDO et al., 1998; MYLES, 1999; ROISIN, 2000). No entanto, em espécies como *Nasutitermes novarumhebridarum* e *Nasutitermes guayanae*, neotênicos ergatoides impedem a diferenciação de outros reprodutores, dominando a reprodução da colônia por longos períodos (ROISIN; PASTEELS, 1987; NOIROT; THORNE, 1988). A fecundidade dos reprodutores ergatoides e a taxa de oviposição é variada, embora estes indivíduos sejam menos férteis do que reprodutores primários e neotênicos ninfoides (MYLES, 1999; ROISIN; KORB, 2010). Em estudos com *N. novarumhebridarum*, Roisin e Pasteels, (1987) verificaram que a postura de ovos por fêmeas ergatoides começou somente seis meses após sua diferenciação de operárias. Dessa forma, ainda que características sexuais se desenvolvam em fêmeas ergatoides, a oviposição pode levar tempo para acontecer, tornando a substituição de reprodutores primários por indivíduos ergatoides muito menos eficiente quando comparado com outros reprodutores secundários (ROISIN; PASTEELS, 1986; LEFEUVE, 1987). Em alguns casos, estes reprodutores podem não atuar na reprodução da colônia, como em *Silvestritermes euamignathus*, no qual algumas características reprodutivas estão ausentes nestes indivíduos, como estocagem de espermatozoides, maturação de ovários e presença de corpo gorduroso real (COSTA-LEONARDO et al., 1998).

Em *Nasutitermes*, reprodutores neotênicos ergatoides podem ser machos ou fêmeas, decorrente de um dimorfismo sexual entre operários (TORALES; CORONEL, 2006). Os machos se desenvolvem a partir de operários pequenos e as fêmeas ergatoides a partir de operários grandes. As análises morfométricas mostraram que as fêmeas ergatoides de *N. aquilinus* apresentavam variação no grau de fisogastria. De acordo com Roisin and Pasteels (1986), os quais avaliaram a fisogastria em fêmeas adultoides de *N. princeps*, as variações apresentadas entre as fêmeas podem ser explicadas pelo tempo de diferenciação, com algumas fêmeas se diferenciando primeiro e, conseqüentemente, adquirindo maior fisogastria. Outra explicação está dentro do contexto social, ou seja, os operários podem alimentar

diferencialmente as fêmeas ergatoides, influenciando na fisogastria de indivíduos de mesma idade.

Por meio da histologia, foi possível constatar a presença de espermatozoides no lúmen da espermateca de fêmeas ergatoides, indicando a ocorrência de cópula envolvendo estas, embora não tenham sido coletados reprodutores machos nos ninhos. Normalmente, devido ao fato do reprodutor macho ser menor, este consegue escapar com mais facilidade durante as coletas. A presença de ovos somente foi constatada no ninho N2 de *N. aquilinus*, o qual possivelmente é uma família estendida. Contudo, pelas evidências histológicas dos ovários nas fêmeas ergatoides das colônias N6 e N11, é provável que a câmara de ovos foi perdida durante a dissecação do ninho. Possivelmente, a fêmeas ergatoides do ninho N11 estavam no início da postura de ovos, o que é reforçado pelas análises genéticas, as quais não indicaram uma ocorrência de família estendida nesta colônia. Outra hipótese é de que a prole destas fêmeas ergatoides não foi amostrada ou genotipada. De acordo com Elliot e Stay (2008), a diferenciação de operários em reprodutores neotênicos é influenciada pela síntese de hormônio juvenil, o qual aumenta de maneira proporcional ao desenvolvimento de ovócitos vitelogênicos. No entanto, há relatos de desenvolvimento prematuro e degeneração de ovócitos, como em *N. corniger*, comprometendo a reprodução destas fêmeas ergatoides (THORNE; NOIROT, 1982). No entanto, este parece não ser o caso das fêmeas ergatoides de *N. aquilinus* analisadas no presente estudo. A presença de corpo gorduroso real foi constatada em todas as fêmeas analisadas por meio de seções histológicas. Analisando o corpo gorduroso real em rainhas de Termitidae, Han e Bordereau (1982) verificaram que este apresenta poucos grânulos de lipídio, diferente do corpo gorduroso de outros indivíduos do ninho, incluindo imagos e fêmeas não-fisogástricas. Adicionalmente, o corpo gorduroso real apresenta células com uma grande quantidade de retículo plasmático rugoso, atuando no metabolismo intermediário de proteínas para os ovócitos.

Noirot (1990) sugere que o grande número de neotênicos compensa a baixa fertilidade destes, ocorrendo de maneira proporcional ao crescimento populacional e à extensão do ninho. Adicionalmente, a ocorrência de múltiplos reprodutores em colônias de insetos sociais proporciona uma diminuição da longevidade destes, segundo modelos aplicados a formigas (DYTHAM; TRAVIS, 2006; HEINZE; SCHREMPF, 2008). A quantidade de reprodutores na mesma colônia, assim como o número de gerações produzidas por estes, pode influenciar a diversidade genética intrapopulacional e a taxa de endogamia, principalmente quando os reprodutores compõem famílias estendidas (VARGO; HUSSENER, 2010). No presente trabalho, todas as colônias amostradas apresentaram quatro alelos, no máximo, o que poderia

limitar a ocorrência de famílias mistas nas mesmas. Além disso, somente um haplótipo mitocondrial foi evidenciado por colônia, reforçando a suposição feita por meio dos marcadores microssatélites. O gene COI, juntamente com o COII, são as ferramentas mitocondriais mais frequentemente empregadas em estudos acerca da estrutura genética em colônias e populações de cupins (VARGO; HUSSENER, 2010). A ocorrência de diferentes haplótipos nestes marcadores, ilustrando diferentes linhagens maternas, sugere a ocorrência de famílias mistas (DEHEER; VARGO, 2008; LUCHETTI et al., 2013; HAIFIG et al., 2016). No entanto, DeHeer e Vargo (2008), amostraram colônias mistas de *Reticulitermes flavipes* com haplótipos idênticos ou com baixa diferenciação na região do gene COII, sugerindo que características associadas a herança materna podem atuar na fusão de colônias. No presente estudo, fêmeas neotênicas ergatoides de três colônias de *N. aquilinus* apresentaram haplótipos similares, sendo que nas colônias N2 e N6, o mesmo haplótipo foi encontrado, mesmo com os ninhos distantes aproximadamente 26km. Por outro lado, a colônia N11, próxima do ninho N2 (aproximadamente 5m), apresentou haplótipo exclusivo, com alteração em dois pares de base. Sendo assim, a distância não parece ser um fator limitante na diversidade de haplótipos, corroborando dados de DeHeer e Vargo (2008). No entanto, poucas alterações no gene COI em diferentes colônias de refletem o caráter conservado deste marcador em *N. aquilinus*, sendo que diversas alterações em pares de base tornariam a diferenciação de famílias mistas mais precisa.

Em relação aos loci de microssatélites, as colônias N2, N3 e N6 apresentaram genótipos inconsistentes com a reprodução envolvendo somente um casal de reprodutores, configurando possíveis famílias estendidas. Os marcadores de microssatélites apresentaram baixa diversidade de alelos entre os ninhos, sendo que o marcador Ncor3 apresentou mais alelos entre estes, com um total de seis. Em espécies invasoras, as quais tendem a apresentar baixa diversidade genética devido a eventos de gargalo de garrafa, a ocorrência de poucos alelos na população pode mascarar a ocorrência de famílias mistas (DRONNET et al., 2005). No entanto, em espécies nativas ou introduzidas em regiões isoladas geograficamente, as características genéticas de famílias estendidas e mistas tendem a se manter normalizadas, com famílias estendidas apresentando uma baixa média de alelos por colônias (entre 2 e 3) (PERDEREAU et al., 2015). Ainda assim, a baixa diversidade de alelos encontradas nas colônias de *N. aquilinus* pode indicar que, nas colônias genotipadas, os alelos eram mais conservados nos loci selecionados como marcadores, de modo que a ocorrência de famílias mistas também pode ser mascarada diante desta situação.

A taxa de populações que apresenta estrutura reprodutiva estendida varia entre as espécies de cupins já estudadas (VARGO; HUSSENER, 2010) e, em algumas investigações,

100% das colônias amostradas eram estruturadas desta forma, sugerindo que o cruzamento entre reprodutores aparentados é parte do ciclo de vida das mesmas, resultando em queda na diversidade genética dos indivíduos em relação à população total ($F_{IT} > 0$) (DRONNET et al., 2005; ALDRICH; KAMBHAPATI, 2007; HUSSENER et al., 2008; LENIAUD et al., 2010). Mesmo sendo classificadas como possíveis famílias estendidas, as colônias N2, N3 e N6 mostraram baixa taxa de endogamia entre companheiros de ninho ($F_{IS} < 0$), semelhante aos valores encontrados em famílias simples. Algumas explicações suportam a ocorrência de famílias estendidas com um baixo índice de endogamia, como por exemplo a quantidade de reprodutores aparentados e de quantas gerações são originadas por estes. Colônias com muitos reprodutores e poucas gerações endogâmicas tendem a apresentar diversidade genética maior em relação à encontrada para esta estrutura genética (VARGO, 2019). Baixos índices de endogamia em colônias com múltiplos reprodutores aparentados também podem ser consequência de ciclos simples de endogamia, os quais não causam redução na diversidade genética intracolônia (THORNE et al., 1999). Por fim, se uma população total apresenta poucas colônias estendidas em relação ao total de amostradas, a redução da diversidade genética a nível colonial não causa interferência significativa a nível populacional, caracterizado pelo índice $F_{IT} < 0$ (VARGO, 2019). Na colônia N11 de *N. aquilinus*, os índices de endogamia e, principalmente, as combinações de alelos se mostraram semelhantes às encontradas em colônias com estrutura de família simples. Sendo assim, parece razoável que estas fêmeas ainda não tiveram a sua primeira prole e são irmãs dos indivíduos estéreis amostrados nas análises genéticas. Outra explicação seria que a prole destas fêmeas ergatoides não foi genotipada.

De acordo com Kitade et al (2011), a reprodução envolvendo neotênicos ergatoides em *Reticulitermes* é fundamental para o desenvolvimento de ninfas, sendo que esta casta não se desenvolve de larvas geradas pela reprodução envolvendo outros reprodutores. Em nossas análises, não houve relação aparente entre a reprodução envolvendo neotênicos ergatoides e o desenvolvimento de ninfas, visto que o ninho N5, o qual possuía ninfas, apresentou estrutura genética consistente com a formação de famílias simples, sem o desenvolvimento de reprodutores secundários.

7. Considerações gerais

- As análises histológicas do abdômen de fêmeas ergatoides de *N. aquilinus* com diferentes graus de fisogastría mostraram desenvolvimento do aparelho reprodutor, com ovócitos em todos os estágios de ovogênese, incluindo estágios terminais, onde a deposição de vitelo atinge as maiores proporções.

- Fêmeas neotênicas ergatoides apresentam espermatozoides no lúmen da espermateca, fato que corrobora a ocorrência de reprodutores machos nas colônias. Além disso, estas fêmeas possuem corpo gorduroso real, característicos de rainhas, diferente do corpo gorduroso normal presente em outras castas, o qual é rico em lipídios.

- As análises genéticas conduzidas no presente estudo mostraram que *N. aquilinus* pode formar famílias simples ou estendidas. No entanto, a baixa diversidade de alelos e as poucas alterações no gene COI precisam ser destacadas, pois podem ter mascarado a formação de famílias mistas.

- A ausência de genótipos associados a família estendida na colônia N11 de *N. aquilinus* mostra que as fêmeas ergatoides presentes nessa colônia poderiam estar em estágios iniciais de oviposição, ou que a prole proveniente destas não foi amostrada. Baseado nos genótipos das amostras e no índice de parentesco ($r = 0.496 \pm 0.080$), é possível concluir que as fêmeas ergatoides eram irmãs das castas estéreis analisadas.

- As colônias N2, N3 e N6 apresentaram estrutura genética semelhante ao de famílias estendidas. Porém, a diversidade genética manteve-se moderada entre as amostras, enquanto o índice de endogamia permaneceu baixo. A baixa diversidade de alelos entre as colônias pode ter mascarado a formação de famílias mistas, de modo que este cenário deve ser considerado em futuras análises conduzidas com *N. aquilinus*.

- Os resultados sugerem que reprodutores ergatoides de *N. aquilinus* não exercem influência no desenvolvimento de ninfas, considerando a ocorrência de ninfas tanto em ninhos com múltiplas fêmeas ergatoides quanto naqueles onde somente um casal atuava na reprodução.

8. Referências

- ABREU, S.; SILVA, K.E.S. Resistência natural de dez espécies madeireiras da Amazônia ao ataque de *Nasutitermes macrocephalus* (Silvestri) e *N. surinamensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). **Revista Árvore**, v. 24, n. 2, p. 229-234, 2000.
- ACDA, M.N. Geographical distribution of subterranean termites (Isoptera) in economically important regions of Luzon, Philippines. **The Philippine Agricultural Scientist**, v. 96, n.2, p. 205-209, 2013.
- ADAMS, E.S.; LEVINGS, S.C. Territory size and population limits in mangrove termites. **The Journal of Animal Ecology**, v. 56, n. 3, p. 1069-1081, 1987.
- ADAMS, E.S.; ATKINSON, L.; BULMER, M.S. Relatedness, recognition errors, and colony fusion in the termite *Nasutitermes corniger*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 61, n. 8, p. 1195-1201, 2007.
- ALVAREZ, S. Potential economic costs of invasive structural pests: conehead termites, *Nasutitermes corniger*, in Florida. **Journal of Environmental Planning and Management**, v. 59, n. 12, p. 2145-2162, 2016.
- ALDRICH, B. T.; KAMBHAMPATI, S. Population structure and colony composition of two *Zootermopsis nevadensis* subspecies. **Nature**, v. 99, n. 4, p. 443–451, 2007.
- ANDREWS, E.A. Observations on termites of Jamaica. **Journal of Animal Behavior**, v. 1, p. 193-228, 1911.
- ATKINSON, L.; ADAMS, E.S. The origins and relatedness of multiple reproductives in colonies of the termite *Nasutitermes corniger*. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 264, n. 1385, p. 1131-1136, 1997a.
- ATKINSON, L.; ADAMS, E.S. Double-strand conformation polymorphism (DSCP) analysis of the mitochondrial control region generates highly variable markers for population studies in a social insect. **Insect Molecular Biology**, v. 6, n. 4, p. 369- 376, 1997b.
- ATKINSON, L.; ADAMS, E.S.; CROZIER, R.H. Microsatellite markers for the polygamous termite *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 7, n. 2, p. 299-301, 2007.
- ATKINSON, L.; TESCHENDORF, G.; ADAMS, E.S. Lack of evidence for nepotism by workers tending queens of the polygynous termite *Nasutitermes corniger*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 62, n. 5, p. 805-812, 2008.
- BANDEIRA, A.G.; GOMES, J.I.; LISBOA, P.L.B.; SOUZA, P.C.S. Insetos pragas de madeiras de edificações em Belém-Para. **Embrapa Amazônia Oriental-Séries anteriores**, p. 1-25, 1989.

BANDEIRA, A.G. Danos causados por cupins na Amazônia. In: FONTES, L.R.; BERTI-FILHO, E. (Org.). **Cupins: O desafio do conhecimento**. Piracicaba: FEALQ, p. 87–98, 1998.

BARBOSA, J.R.C.; MOURA, F.M.D.S.; BANDEIRA, A.G.; VASCONCELLOS, A. Caste differentiation pathways in the neotropical termite *Armitermes holmgreni* (Isoptera: Termitidae). **Zoological Science**, v. 2, n. 11, p. 738-742, 2012.

BARBOSA, J. R. C.; CONSTANTINO, R. Polymorphism in the neotropical termite *Serritermes serrifer*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 163, p. 1, p.43-50, 2017.

BATHELLIER, J. Contribution à l'étude systématique et biologie des termites de l'Indochine. **Faune des Colonies Francaises**, v. 1, p. 121-365, 1927.

BOURGUIGNON, T.; ŠOBOTNÍK, J.; HANUS, R.; ROISIN, Y. Developmental pathways of *Glossotermes oculatus* (Isoptera, Serritermitidae): at the cross-roads of worker caste evolution in termites. **Evolution & development**, v. 11, n.6, p. 659-668, 2009.

BOURGUIGNON, T.; LO, N.; CAMERON, S.L.; ŠOBOTNÍK, J.; HAYASHI, Y.; SHIGENOBU, S.; WATANABE, S.; ROISIN, Y.; MIURA, T.; EVANS, T.A. The evolutionary history of termites as inferred from 66 mitochondrial genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 2, p. 406-421, 2014.

BOURGUIGNON, T.; ŠOBOTNÍK, J.; DAHLSJÖ, C.A.L.; ROISIN, Y. The soldierless Apicotermatinae: insights into a poorly known and ecologically dominant tropical taxon. **Insectes Sociaux**, v. 63, n. 1, p. 39-50, 2016.

BOURGUIGNON, T.; LO, N.; ŠOBOTNÍK, J.; HO, S.Y.; IQBAL, N.; COISSAC, E.; LEE, M.; JENDRYKA, M.M.; SILLAM-DUSSÈS, D.; KŘÍŽKOVÁ, B.; ROISIN, Y.; EVANS, T.A. Mitochondrial phylogenomics resolves the global spread of higher termites, ecosystem engineers of the tropics. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 3, p. 589-597, 2017.

BRIGHTSMITH, D.J. Use of arboreal termitaria by nesting birds in the Peruvian Amazon. **The Condor**, v. 102, n. 3, p. 529-538, 2000.

BULMER, M.S.; ADAMS, E.S.; TRANIELLO, J.F.A. Variation in colony structure in the subterranean termite *Reticulitermes flavipes*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 49, p. 236-243, 2001.

CARVALHO, T.M.; CARVALHO, C.M. Interrelation of geomorphology and fauna of Lavrado region in Roraima, Brazil-suggestions for future studies. **Quaternary Science Journal**, v. 61, n. 2, p. 146–155, 2012.

CHOUVENC, T.; SU, N.Y. Irreversible transfer of brood care duties and insights into the burden of caregiving in incipient subterranean termite colonies. **Ecological entomology**, v. 42, n. 6, p. 777-784, 2017.

CONSTANTINO, R. Notes on the type-species and synonymy of the genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae). **Sociobiology**, v. 40, n. 3, p. 533-538, 2002a.

- CONSTANTINO, R. The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. **Journal of Applied Entomology**, v. 126, n. 7- 8, p. 355-365, 2002b.
- CONSTANTINO, R. **Online Termite Database**. Disponível em: <<http://164.41.140.9/catal/>>. Acesso em 15 nov 2018.
- CORNETTE, R.; GOTOH, H.; KOSHIKAWA, S; MIURA, T. Juvenile hormone titers and caste differentiation in the damp-wood termite *Hodotermopsis sjostedti* (Isoptera, Termopsidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 54, n. 6, p. 922-930, 2008.
- COSARINSKY, M. I. Comparative micromorphology of arboreal and terrestrial carton nests of the neotropical termite *Nasutitermes aquilinus* (Isoptera: Termitidae). **Sociobiology**, v. 45, p. 839-852, 2005.
- COSTA-LEONARDO, A.M.; SOARES, H.X.; BARSOTTI, R.C. Response to orphaning in two Neotropical termites: *Armitermes euamignathus* and *Embiratermes festivellus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 88, n. 2, p. 109-114, 1998.
- COSTA-LEONARDO, A.M.; BARSOTTI, R.C.; SOARES, H.X. Morphology of the nymphoid replacement reproductives in the neotropical termite *Silvestritermes euamignathus* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). **Journal of Morphology**, v. 239, n. 2, p. 131-141, 1999.
- CUNHA, H.F.D.; BRANDÃO, D. Multiple reproductives in nests of the Neotropical termite *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 46, n. 1, p. 21-24, 2002.
- DECHMANN, D.K.; SANTANA, S.E.; DUMONT, E.R. Roost making in bats—adaptations for excavating active termite nests. **Journal of Mammalogy**, v. 90, n. 6, p. 1461- 1468, 2009.
- DEDEINE, F.; DUPONT, S.; GUYOT, S.; MATSUURA, K.; WANG, C.; HABIBPOUR, B.; BAGNÈRES, A.G.; MANTOVANI, B.; LUCHETTI, A. Historical biogeography of *Reticulitermes* termites (Isoptera: Rhinotermitidae) inferred from analyses of mitochondrial and nuclear loci. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 94, p. 778-790, 2016.
- DEHEER, C. J.; VARGO, E. L. Strong mitochondrial DNA similarity but low relatedness at microsatellite loci among families within fused colonies of the termite *Reticulitermes flavipes*. **Insectes Sociaux**, v. 55, n. 2, p. 190-199, 2008.
- DRONNET, S.; CHAPUISAT, M.; VARGO, E. L.; LOHOU, C.; BAGNÈRES, A. G. Genetic analysis of the breeding system of an invasive subterranean termite, *Reticulitermes santonensis*, in urban and natural habitats. **Molecular Ecology**, v. 14, p.1311–1320, 2005.
- DYTHAM, C.; TRAVIS, J. Evolving dispersal and age at death. **Oikos**, v. 113, n. 3, p. 530-538, 2006.

- ELLIOT, K. L.; STAY, B. Changes in juvenile hormone synthesis in the termite *Reticulitermes flavipes* during development of soldiers and neotenic reproductives from groups of isolated workers. **Journal of insect physiology**, v. 54, n. 2, p.492-500, 2008.
- ENGEL, M.S.; GRIMALDI, D.A.; KRISHNA, K. Termites (Isoptera): their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. **American Museum Novitates**, p. 1-27, 2009.
- EVANS, T.A. Invasive termites. In: ABE, T.; BIGNELL, D.E.; HIGASHI, M. (Org.). **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**. London: Kluwer Academic, Springer, Dordrecht, p. 519-562, 2010.
- FONTES, L.R. *Atlantitermes*, novo genero de cupim, com duas novas especies do Brasil (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 23, p. 219-227, 1979.
- FONTES, L.R.; MILANO, S. Termites as an urban problem in South America. **Sociobiology**, v. 40, n.1, p. 103-152, 2002.
- FOUGEYROLLAS, R. DOLEJŠOVA, K.; SILLAM-DUSSÈS, D.; ROY, V.; POTEAUX, C.; HANUS, R.; ROISIN, Y. Asexual queen succession in the higher termite *Embiratermes neotenicus*. **Proceedings Royal Society B**, v. 282: 20150260, 2015.
- FOUGEYROLLAS, R.; KRIVANÉK, J.; ROY, V.; DOLEJŠOVA, K.; FRECHAULT, S.; ROISIN, S.; HANUS, R.; SILLAM-DUSSÈS, D. Asexual queen succession mediates an accelerated colony life cycle in the termite *Silvestritermes minutus*. **Molecular Biology**, 2017. doi: 10.1111/mec.14095.
- FOURNIER, D.; HELLEMANS, S.; HANUS, R.; ROISIN, Y. asexual reproduction and genetic diversity of populations in the humivorous termite *Cavitermes tuberosus*. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 283, n. 1832: 20160196, 2016.
- GARCIA, J.; MAEKAWA, K.; MIURA, T.; CONSTANTINO, R.; MATSUMOTO, T. Genetic distance between nests and population genetic diversity of *Nasutitermes nigriceps* and *N. corniger* (Isoptera: Termitidae) in Guatemala using AFLP markers. **Sociobiology**, v. 56, p. 70-83, 2003.
- GAY, F.J.; CALAB, J.H. Termites of the Australian region. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F.M. (Org.). **Biology of Termites**. New York: Academic Press, 1970. p. 393-448.
- GOODISMAN, M.A.; CROZIER, R.H. Population and colony genetic structure of the primitive termite *Mastotermes darwiniensis*. **Evolution**, v. 56, n.1, p. 70-83, 2002.
- GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, 2001.2
- GRANDI, G.; BARBIERI, R.; COLOMBO, G. Oogenesis in *Kaloterme flavicollis* (Fabr.) (Isoptera: Kalotermitidae). I. Differentiation and maturation of oocytes in female supplementary reproductives. **Italian Journal of Zoology**, v. 55, p. 103-122, 1988

- GRASSÉ, P. P. Termitologia, vol. I. **Anatomie, physiologie, reproduction des termites**, 1982.
- HAIFIG, I.; COSTA-LEONARDO, A.M. Caste differentiation pathways in the Neotropical termite *Silvestritermes euamignathus* (Isoptera: Termitidae). **Entomological Science**, v. 19, n. 3, p. 174-179, 2016.
- HAIFIG, I.; VARGO, E.L.; LABADIE, P.; COSTA-LEONARDO, A.M. Unrelated secondary reproductives in the neotropical termite *Silvestritermes euamignathus* (Isoptera: Termitidae). **The Science of Nature**, v. 103, n. 1-2, p. 2-8, 2016.
- HACKER, M.; KAIB, M.; BAGINE, R.K.N.; EPPLER, J.T.; BRANDL, R. Unrelated queens coexist in colonies of the termite *Macrotermes michaelseni*. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 5, p. 1527- 1532, 2005.
- HAN; BORDEREAU. Ultrastructure of the fat body of the reproductives in higher termites. **Journal of Morphology**, v. 172, n. 3, p. 313-322, 1982.
- HARTKE, T. R.; BAER, B. The mating biology of termites: a comparative review. **Animal Behaviour**, v. 82, n. 5, p. 927-936, 2011.
- HARTKE, T.R.; ROSENGAUS, R.B. Costs of pleometrosis in a polygamous termite. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 280, n. 1756: 20122563, 2013.
- HAYASHI, Y.; LO, N.; MIYATA, H.; KITADE, O. Sex-linked genetic influence on caste determination in a termite. **Science**, v. 318, n. 5852, p. 985-987, 2007.
- HELLEMANS, S.; FOURNIER, D.; HANUS, R.; ROISIN, Y. Investigating key traits for AQS emergence in Termitinae. In: **Proceedings of the 6th European Meeting of the International Union for the Study of Social Insects**, 8–11 August 2016. p. 67 (University of Helsinki: Helsinki, Finland), 2016.
- HELLEMANS, S.; FOURNIER, D.; HANUS, R.; ROISIN. Secondary queens in the parthenogenetic termite *Cavitermes tuberosus* develop through a transitional helper stage. **Evolution & Development**, v. 19, n. 6, p.253-262, 2017.
- HEINZE, J.; SCHREMPF, A. 2008. Aging and reproduction in social insects – A mini review. *Gerontology*, 54: 160-167.
- HIGASHI, M.; Yamamura, N.; ABE, T. Theories on the sociality of termites. In: ABE, T.; BIGNELL, D. E.; HIGASHI, M. (eds.), **Termites: Evolution, sociality, symbioses, ecology**. p. 169-187. Dordrecht: Springer, 2000.
- HILL, G.F. Termites (Isoptera) from the Australian region. **Council for Scientific and Industrial Research Organisation**, Melbourne, 1942.
- HOLMGREN, N. Termites from British India (near Bombay, in Gujarat and Bangalore) collected by De. J. ASSMUTH, S.J. **Journal of the Bombay Natural History Society**, v. 22, p. 107-117, 1913.

- HUANG, Q.; LI, G.; HUSSENER, C.; LEI, C. Genetic analysis of population structure and reproductive mode of the termite *Reticulitermes chinensis* Snyder. **PloS One**, v. 8, n. 7, p. e69070, 2013.
- HUSSENER, C.; POWELL, J. E.; GRACE, J. K.; VARGO, E. L.; MATSUURA, K. Worker size in the Formosan subterranean termite in relation to colony breeding structure as inferred from molecular markers. **Environmental entomology**, v.37, n. 2, p. 400-408, 2008.
- INWARD, D.; BECCALONI, G. Death of an order : A comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. **Biology letters**, v. 3, n. 3, p. 331-335, 2007.
- JOHNSON, S.E.; BREISCH, N.L.; MOMEN, B.; THORNE, B.L. Morphology and gonad development of normal soldiers and reproductive soldiers of the termite *Zootermopsis nevadensis nevadensis* (Isoptera, Archotermopsidae). **ZooKeys**, v. 148, p. 15-30, 2011.
- KEMNER, N.A. Systematische und biologische Studien über die Termiten Javas und Celebes'. **Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar**, v. 13, p. 41–241, 1934.
- KITADE, O.; HOSHI, M.; ODAIRA, S.; ASANO, A.; SHIMIZU, M.; HAYASHI, Y.; LO, N. Evidence for genetically influenced caste determination in phylogenetically diverse species of the termite genus *Reticulitermes*. **Biology Letters**, v. 7, p. 257-260, 2011.
- KORB, J.; ROUX, E.A. Why join a neighbour: fitness consequences of colony fusions in termites. **Journal of evolutionary biology**, v. 25, n. 11, 2161-2170, 2012.
- KRISHNA, K.; GRIMALDI, D.A.; KRISHNA, V.; ENGEL, M.S. Treatise on the Isoptera of the World. **Bulletin of the american museum of natural history**, v. 377, p. 1- 2704, 2013.
- KRONAUER, D.J.; SCHÖNING, C; D'ETTORRE, P.; BOOMSMA, J. J. Colony fusion and worker reproduction after queen loss in army ants. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 277, p. 755-763, 2010.
- LAFFONT, E. R. Nest Architecture, Colony Composition and Feeding Substrates of *Nasutitermes coxipoensis* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae) in Subtropical Biomes of Northeastern Argentina. **Sociobiology**, v. 59, n. 4, p. 1297-1313, 2014.
- LEFEUVE, P. Replacement queens in the neotropical termite *Nasutitermes coxipoensis*. **Insectes sociaux**, v. 34, n. 1, p. 10-19, 1987.
- LENIAUD, L.; DEDEINE, F.; PICHON, A.; DUPONT, S.; BAGNÈRES, A. G. Geographical distribution, genetic diversity and social organization of a new European termite, *Reticulitermes urbis* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Biological invasions**, v. 12, n. 5, p. 1389-1402, 2010.
- LIMA, J. T.; VARGO, E. L.; COSTA-LEONARDO, A. M. Desenvolvimento de marcadores microsatélites para análises genéticas em *Velocitermes heteropterus* (Isoptera: Termitidae). **Resumo do I Workshop sobre Insetos Sociais**, Ribeirão Preto, SP., 2013.

- LISBOA, J.T.; COUTO, E.D.C.G.; SANTOS, P.P.; DELABIE, J.H.C.; ARAUJO, P.B. Terrestrial isopods (Crustacea: Isopoda: Oniscidea) in termite nests (Blattodea: Termitidae) in a cocoa plantation in Brazil. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 3, p. 393-397, 2013.
- LO, N; TOKUDA, G; WATANABE, H; ROSE, H; SLAYTOR, M; MAEKAWA, K; BANDI, C; NODA, H. Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. **Current Biology**, v. 10, p. 801–804, 2000.
- LUCHETTI, A.; VELONÀ, A.; MUELLER, M.; MANTOVANI, B. Breeding system and reproductive strategies in Italian *Reticulitermes* colonies (Isoptera: Rhinotermitidae). **Insectes Sociaux**, v. 60, n. 2, p. 203-211, 2013.
- MAEKAWA, K.; MIZUNO, S.; KOSHIKAWA, S.; MIURA, T. Compound eye development during caste differentiation in the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Zoological Science**, v. 25, n. 7, p. 699-705, 2008.
- MARTIUS, C. Diversity and ecology of termites in Amazonian forests. **Pedobiology**, v. 38, p. 407-428, 1994.
- MATSUURA, K. Sexual and asexual reproduction in termites. In: BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. (eds.) **Biology of termites: a modern synthesis**. Dordrecht: Springer, p. 255-277, 2010.
- MATSUURA, K. Evolution of the asexual queen succession system and its underlying mechanisms in termites. **Journal of Experimental Biology**, v. 220, n.1, p. 63-72, 2017.
- MATSUURA, K.; NISHIDA, T. Colony fusion in a termite: What makes the society "open"? **Insectes Sociaux**, v. 48, n. 4, p. 378-383, 2001.
- MATSUURA, K.; VARGO, E. L.; KAWATSU, K.; LABADIE, P.; NAKANO, H.; YASHIRO, T.; TSUJI, K. Queen succession through asexual reproduction in termites. **Science**, v. 323, n. 5922, p. 1687-1687, 2009.
- MILL, A.E. Termites as agricultural pests in Amazonia, Brazil. **Outlook on Agriculture**, v. 21, p. 41–46, 1992.
- MILLER, E. M. Caste differentiation in lower termites. In: KRISHNA, K; WEESNER, F. M. (Eds). **Biology of termites**. New York, Academic Press, p. 283-307, 1969.
- MITCHELL, J.D. Swarming and pairing in the fungus-growing termite, *Macrotermes natalensis* (Haviland) (Isoptera: Macrotermitinae). **African Entomology**, v. 15, n. 1, p.153-160, 2007.
- MITCHELL J.D. Swarming flights of the fungus-growing termite, *Macrotermes natalensis* (Haviland) (Isoptera: Macrotermitinae), and the environmental factors affecting their timing and duration. **African Entomology**, v. 16, n. 2, p. 143-152, 2008.
- MIURA, T. Morphogenesis and gene expression in the soldier-caste differentiation of termites. **Insectes Sociaux**, v. 48, n. 3, p. 216-223, 2001

- MIURA T.; MATSUMOTO, T. Ergatoid reproductives in *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae). **Sociobiology**, v. 27, n. 2, p. 223-238, 1996.
- MIURA, T.; ROISIN, Y.; MATSUMOTO, T. Molecular phylogeny and biogeography of the nasute termite genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) in the Pacific tropics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2000.
- MYLES, T.G. Review of secondary reproduction in termites (Insecta: Isoptera). **Sociobiology**, v. 33, p. 1-91, 1999.
- NALEPA, C. A.; LENZ, M. The ootheca of *Mastotermes darwiniensis* Froggatt (Isoptera: Mastotermitidae): homology with cockroach oothecae. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1454, p. 1809-1813.
- NEOH, K.B.; LENZ, M.; LEE, C.Y. Impact of orphaning on field colonies of Southeast Asian *Macrotermes gilvus* (Hagen) and *M. carbonarius* (Hagen) (Termitidae, Macrotermitinae). **Insectes sociaux**, v. 57, n. 4, p.431-439, 2010.
- NOIROT, C. Les sexués de remplacement chez les termites supérieurs (Termitidae). **Insectes Sociaux**, v. 3, n. 1, p. 145-158, 1956.
- NOIROT, C. Formation of castes in the higher termites. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F.M. (Org.). **Biology of termites**. New York, Academic Press, p. 311–350, 1969.
- NOIROT, C. Differentiation of reproductives in higher termites. In: WATSON, J.A.L.; OKOT-KOTBER, B.N.; NOIROT, C. (Org.). **Caste Differentiation in Social Insects**. Oxford, Pergamon Press, p. 177–186, 1985.
- NOIROT, C. Social structure in termite societies. **Ethology, Ecology & Evolution**, v. 1, n. 1, p. 1-17, 1989.
- NOIROT, C. Sexual castes and reproductive strategies in termites. In: ENGELS, W. (Org.). **Social Insects**. Heidelberg, Springer, p. 5-35, 1990.
- NOIROT, C.; THORNE, B.L. Ergatoid reproductives in *Nasutitermes columbicus* (Isoptera, Termitidae). **Journal of Morphology**, v. 195, n. 1, p. 83-93, 1988.
- NOIROT, C.; BORDEREAU, C. Termite polymorphism and morphogenetic hormones. **Morphogenetic hormones of arthropods**, v. 3, p. 295-324, 1991.
- NUTTING, W.L. Flight and colony foundation. In: KRISHNA, K; WEESNER, F.M. (Org.). **Biology of termites**. New York, Academic Press, p. 233-282, 1969.
- OHKUMA, M.; YUZAWA, H.; AMORNSAK, W.; SORNNUWAT, Y.; TAKEMATSU, Y.; YAMADA, A.; VONGKALUANG, C.; SARNTHOY, O.; KIRTIBUTR, N.; NOPARATNARAPORN, N.; KUDO, T.; INOUE, T. Molecular phylogeny of Asian termites (Isoptera) of the families Termitidae and Rhinotermitidae based on mitochondrial COII sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 31, n. 2, p. 701-710, 2004.

- OLIVEIRA, D.E.; CARRIJO, T.F.; BRANDÃO, D. Species composition of termites (Isoptera) in different Cerrado vegetation physiognomies. **Sociobiology**, v. 60, n. 2, p. 190-197, 2013.
- PARMAN, V.; VARGO, E.L. Population density, species abundance, and breeding structure of subterranean termite colonies in and around infested houses in central North Carolina. **Journal of economic entomology**, v. 101, n. 4, p. 1349-1359, 2008.
- PEARCE, M.J. A list of termite genera (Isoptera) with comments on taxonomic changes and regional distribution. **Sociobiology**, v. 23, p. 247-263, 1994.
- PERDEREAU, E.; BAGNÈRES, A. G.; VARGO, E. L.; BAUDOUIN, G.; XU, Y.; LABADIE, P.; DUPONT, S.; DEDEINE, F. Relationship between invasion success and colony breeding structure in a subterranean termite. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 9, p. 2125-2142, 2015.
- RAINA, A.; MURPHY, C.; FLORANE, C.; WILLIAMS, K.; PARK, Y.I.; INGBER, B. Structure of the spermatheca, sperm dynamics, and associated bacteria in Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 100, n. 3, p. 418-424, 2007.
- REEVE, H.K. The evolution of conspecific acceptance thresholds. **The American Naturalist**, v. 133, n.3, p. 407-435, 1989.
- ROISIN, Y. Queen replacement in the termite *Microcerotermes papuanus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 56, n.1, p. 83-90, 1990.
- ROISIN, Y. Selective pressures on pleometrosis and secondary polygyny: a comparison of termites and ants. In: KELLER, L. (Org.). **Queen number and sociality in insects**. Oxford, Oxford University Press, 1993. p. 402-421, 1993.
- ROISIN, Y. Diversity and evolution of caste patterns. In: ABE, T.; BIGNELL, D.E.; HIGASHI, M. (Org.). **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**. London, Kluwer Academic, 2000. p. 95-119.
- ROISIN, Y.; KORB, J. Social organisation and the status of workers in termites. In: BIGNELL, D.E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Org.). **Biology of termites: a modern synthesis**. Springer, Dordrecht, p. 133-164, 2010.
- ROISIN, Y.; PASTEELS, J.M. Imaginal polymorphism and polygyny in the Neo- Guinean termite *Nasutitermes princeps* (Desneux). **Insectes Sociaux**, v. 32, n. 2, p. 140-157, 1985.
- ROISIN, Y.; PASTEELS, J.M. Replacement of reproductives in *Nasutitermes princeps* (Desneux) (Isoptera: Termitidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 18, n. 6, p. 437-442, 1986.
- ROISIN, Y.; PASTEELS, J.M. Caste developmental potentialities in the termite *Nasutitermes novarumhebridarum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 44, n. 3, p. 277-287, 1987.

- ROONWAL, M.L. Termites of the Oriental Region. In: KRISHNA, K.; WEESNERM F.M. **Biology of termites**. New York, Academic Press, 1970. p. 315–391.
- ROSENGAUS, R.B.; TRANIELLO, J.F. Biparental care in incipient colonies of the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis* Hagen (Isoptera: termopsidae). **Journal of Insect Behavior**, v. 4, n. 5, p. 633-647, 1991.
- ROY, V.; DUPONT, L.; HARRY, M. Parentage analysis in Gabonese colonies of soil-feeding termites belonging to the *Cubitermes sp. affinis subarquatus* complex of species (Termitidae: Termitinae). **Insect science**, v. 17, n. 2, p. 84-90, 2010.
- SANDS, W.A. The soldierless termites of Africa (Isoptera: Termitidae). **Bulletin of the British Museum (Natural History)**, v. 18, p. 1–244, 1972.
- SCHEFFRAHN, R.H.; CABRERA, B.J.; KERN JR, W.H.; SU, N.Y. *Nasutitermes costalis* (Isoptera: Termitidae) in Florida: first record of a non-endemic establishment by a higher termite. **Florida Entomologist**, v. 85, n. 1, p. 273-275, 2002.
- SCHEFFRAHN, R.H.; HOCHMAIR, H.H.; KERN JR, W.H.; WARNERN, J.; KRECEK, J.; MAHARAJH, B.; CABRERA, B.J.; HICKMAN, R.B. Targeted elimination of the exotic termite, *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), from infested tracts in southeastern Florida. **International Journal of Pest Management**, v. 60, n. 1, p. 9-21, 2014.
- MILLSILVA, A.G.A.; GONÇALVES, C.R.; GALVÃO, D.M.; GONÇALVES, A.J.L.; GOMES, J; SILVA, M.N.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitas e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968.
- SJÖSTEDT, Y. Termiten aus Kamerun. **Entomologisk Tidskrift**, v. 17, p. 297-298, 1896.
- SNYDER, T.E. **Catalog of the termites (Isoptera) of the world** (Vol. 112). Washington: Smithsonian Institution, 1949.
- STANSLY, P.A. Parthénogenèse chez *Velocitermes* spp. (Isoptera: Nasutitermitinae). **Comptes rendus de l'Academie de Sciences**, v. 304, n. 17, p. 457-460, 1987.
- STANSLY, P.A.; KORMAN, A.K. Parthenogenic development in *Velocitermes* spp. (Isoptera: Nasutitermitinae). **Sociobiology**, 23 (1), 13-24.
- THOMPSON, G.J.; HEBERT, P.D. Population genetic structure of the neotropical termite *Nasutitermes nigriceps* (Isoptera: Termitidae). **Nature Heredity**, v. 80, n. 1, p. 48, 1998.
- THORNE, B.L. Polygyny in termites: Multiple primary queens in colonies of *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae). **Insectes Sociaux**, v. 29, n.1, p. 102-117, 1982.
- THORNE, B.L. Polygyny in the Neotropical termite *Nasutitermes corniger*: life history consequences of queen mutualism. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 14, n. 2, p. 117-136, 1984.

- THORNE, B.L. Termite terminology. **Sociobiology**, v. 28, n. 3, p. 253-263, 1996.
- THORNE, B.L.; NOIROT, C. Ergatoid reproductives in *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 11, n. 3-4, p. 213-226, 1982.
- THORNE, B.L.; TRANIELLO, J.F.A.; ADAMS, E.S.; BULMER, M. Reproductive dynamics and colony structure of subterranean termites of the genus *Reticulitermes* (Isoptera Rhinotermitidae): a review of the evidence from behavioral, ecological, and genetic studies. **Ethology Ecology & Evolution**, v. 11, n. 2, p. 149-169, 1999.
- TORALES, G.J. Rol de los isópteros en la Argentina. In: FONTES, L.R.; BERTI-FILHO, E. (Org.). **Cupins: O desafio do conhecimento**. Piracicaba, FEALQ, p. 413–435, 1998.
- TORALES, G. J.; LAFFONT, E. R.; ARBINO, M. O.; GODOY, M. C. Primera lista faunística de los isópteros de la Argentina. **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**. v. 56, p. 47-53, 1997.
- TORALES, G.J.; CORONEL, J.M. Reproductive ergatoids in nests of *Nasutitermes aquilinus* (Isoptera: Termitidae, Nasutitermitinae). **Sociobiology**, v. 48, n. 1, p. 209-221, 2006.
- TSANTARLIS, K. **Polimorfismo e poligenia de rainhas no cupim neotropical *Nasutitermes aquilinus* (Dictyoptera: Termitidae: Nasutitermitinae)**. [s.l.] Universidade Federal de São Paulo, 2015.
- VARGO, E.L. Genetic structure of *Reticulitermes flavipes* and *R. virginicus* (Isoptera: Rhinotermitidae) colonies in an urban habitat and tracking of colonies following treatment Hexaflumuron bait. **Molecular Ecology and Evolution**, v. 32, n. 5, p. 1271-1282, 2003.
- VARGO, E. L. Diversity of termite breeding system. **Insects**, v. 10, n. 2, p. 52, 2019.
- VARGO, E.L.; CARLSON, J.R. Comparative study of breeding systems of sympatric subterranean termites (*Reticulitermes flavipes* and *R. hageni*) in central North Carolina using two classes of molecular genetic markers. **Environmental Entomology**, v. 35, n. 1, p. 173-187, 2006.
- VARGO, E.L.; HUSSENER, C. Biology of subterranean termites: insights from molecular studies of *Reticulitermes* and *Coptotermes*. **Annual review of entomology**, v. 54, p. 379-403, 2009.
- VARGO, E.L.; HUSSENER, C. Genetic structure of termite colonies and populations. In: BIGNELL, D.E.; ROISIN, Y.; LO, N (Org.). **Biology of termites: a modern synthesis**. Dordrecht, Springer, 2010. p. 321-347, 2010.
- VARGO, E.L.; LABADIE, P.; MATSUURA, K. Asexual queen succession in the subterranean termite *Reticulitermes virginicus*. **Proceedings of the Royal Society of London** 2, v. 279, n. 1729, p. 813 – 819, 2012.

VARGO, E.L.; LENIAUD, L.; SWOBODA, L.E.; DIAMOND, S.E.; WEISER, M.D.; MILLER, D.M.; BAGNÈRES, A.G. Clinal variation in colony breeding structure and level of inbreeding in the subterranean termites *Reticulitermes flavipes* and *R. grassei*. **Molecular ecology**, v. 22, n. 5, p. 1447-1462, 2013.

VASCONCELLOS, A.; MOURA, F.M.S. Wood litter consumption by three species of *Nasutitermes* termites in an area of the Atlantic Coastal Forest in northeastern Brazil. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2010.

WALLIS, D.I. Aggression in social insects. In: CARTHY, J.D.; EBELING, F.J. (Org.). **The natural history of aggression**. New York, Academic Press, 1964. p. 15-22.

WATANABE, D.; GOTOH, H.; MIURA, T.; MAEKAWA, K. Social interactions affecting caste development through physiological actions in termites. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 127, 2014.

WEESNER, F.M. Evolution and biology of the termites. **Annual Review of Entomology**, v. 5, n. 1, p. 153-170, 1960.

WILSON, E. O. **The insect societies**. Cambridge: Harvard University Press, 1971.

WILSON, E.O.; HÖLLDOBLER, B. Eusociality: origin and consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 38, p. 13367-13371, 2005.

9. Anexos

Quadro A1: Castas do ninho N1 e os respectivos alelos presentes na colônia

Ninho 1										
microsat amostra	Ncor3		Vh19-1		Vh22-1		Na2296		Se5	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
N1Op1	64	67	99	108	127	136	66	66	207	207
N1Op2	61	64	87	99	133	136	66	162	207	207
N1Op3	64	67	99	108	127	136	66	162	207	207
N1Op4	61	64	99	108	127	136	66	162	207	207
N1Op5	61	64	87	99	133	136	66	162	195	207
N1Op7	64	64	99	108	127	136	66	162	207	207
N1Op8	61	64	99	108	127	136	66	162	207	207
N1Op9	61	64	87	108	127	136	66	162	207	207
N1Op10	64	64	99	108	127	136	66	162	195	207
N1S1	64	64	99	108	127	136	66	162	207	207
N1S2	61	64	99	108	127	136	66	162	207	207
N1S3	64	64	87	99	127	136	66	162	207	207
N1S4	64	67	99	108	127	136	66	162	195	207
N1S5	64	67	99	108	133	136	66	162	207	207
N1S7	64	67	99	108	133	136	66	162	207	207
N1S9	64	67	99	108	127	136	66	162	195	207
N1S10	64	64	99	108	127	136	66	162	207	207

A1 e A2 = alelos, Op = operário, S = Soldado

Quadro A2: Castas do ninho N2 e os respectivos alelos presentes na colônia

Ninho 2										
microsat amostra	Ncor3		Vh19-1		Vh22-1		Na2296		Se5	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
N2Op1	64	88	99	108	127	136	66	162	195	207
N2Op2	64	64	87	99	133	136	66	162	195	195
N2Op4	64	64	99	108	127	127	66	162	195	207
N2Op5	61	64	99	108	127	136	66	162	195	207
N2Op6	61	64	99	108	127	136	66	162	195	207
N2Op7	61	76	75	99	127	136	66	162	195	195
N2Op8	64	64	99	108	136	136	66	162	195	207
N2Op9	64	88	99	108	127	136	66	162	195	195
N2Op10	64	64	99	99	127	136	66	162	195	195
N2Op11	61	64	99	108	133	136	66	162	195	195
N2Op14	64	64	99	108	127	136	66	66	195	207
N2Op15	64	76	87	108	127	136	66	162	195	207
N2Op16	64	76	75	108	127	136	66	162	195	207
N2Op18	64	64	99	108	127	136	66	162	195	207
N2Op20	64	88	99	108	127	136	66	66	195	195
N2S1	61	64	99	108	127	136	66	162	195	207
N2S2	64	76	99	108	127	136	66	162	195	195
N2S4	64	76	99	108	127	136	66	162	195	195
N2S5	64	64	99	108	127	136	66	162	195	195
N2S6	64	64	99	108	127	136	66	162	195	195
N2S7	61	64	87	99	127	127	66	162	195	207
N2S8	64	64	99	108	127	136	66	162	195	195
N2S11	61	64	99	99	136	136	66	162	195	207
N2S13	64	64	99	108	127	136	66	162	195	195
N2S14	64	64	99	108	133	136	66	162	195	195
N2S15	64	64	99	99	127	136	66	66	195	207
N2S16	61	64	99	99	136	136	66	162	195	195
N2S17	64	64	87	99	127	136	66	162	195	207
N2S18	64	64	99	108	127	136	66	162	195	207
N2S19	61	64	99	99	127	136	66	162	195	195
N2S20	64	76	99	108	127	136	66	162	195	207
N2E1	61	64	99	108	127	136	66	162	195	207
N2E2	61	64	99	108	133	136	66	162	195	207
N2E3	61	64	99	108	127	132	66	162	195	207
N2E4	61	64	99	108	133	132	66	162	195	195
N2E5	61	64	99	108	133	136	66	162	195	195
N2E6	61	64	99	108	136	136	66	162	195	195
N2E7	61	76	99	108	127	132	66	162	195	207
N2E8	61	64	99	108	127	136	66	162	195	207
N2E9	61	76	99	99	127	136	66	162	195	207
N2E10	61	64	99	99	127	136	66	162	195	207
N2E11	61	64	99	108	133	136	66	162	195	207
N2E12	61	64	99	108	127	132	66	162	195	207
N2E13	61	64	99	108	136	136	66	162	195	207
N2E14	61	64	99	108	133	136	66	162	195	195

A1 e A2 = alelos, Op = operário, S = Soldado, E = ergatoide

Quadro A3: Castas do ninho N3 e os respectivos alelos presentes na colônia

Ninho 3										
microsat amostra	Ncor3		Vh19-1		Vh22-1		Na2296		Se5	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
N3Op2	64	64	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Op3	64	67	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Op4	64	64	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Op7	64	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Op8	64	67	99	108	127	133	66	162	207	207
N3Op10	64	76	99	108	127	133	66	162	207	207
N3Op13	64	64	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Op15	64	64	99	108	133	136	66	162	207	207
N3Op16	64	67	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Op17	64	76	99	108	127	136	66	66	207	207
N3Op18	64	64	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Op19	64	67	99	108	127	133	66	162	207	207
N3S1	64	64	99	108	127	136	66	162	207	207
N3S4	64	64	99	108	133	136	66	162	207	207
N3S7	64	76	99	108	136	136	66	162	207	207
N3S10	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N3S11	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N3S12	67	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N3S13	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N3S14	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N3S15	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N3S16	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N3S18	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N3S19	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N3S20	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Ni2	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Ni5	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Ni8	67	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Ni9	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Ni10	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Ni14	76	76	99	108	133	136	66	162	207	207
N3Ni16	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Ni17	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Ni18	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N3Ni20	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207

A1 e A2 = alelos, Op = operário, S = Soldado, Ni = ninfa

Quadro A4: Castas do ninho N4 e os respectivos alelos presentes na colônia

Ninho 4										
microsat amostra	Ncor3		Vh19-1		Vh22-1		Na2296		Se5	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
N4Op1	73	76	99	108	127	136	66	162	195	207
N4Op2	76	88	99	108	127	136	66	162	195	207
N4Op3	76	76	99	108	127	136	66	162	195	207
N4Op5	76	76	99	108	127	136	66	162	195	207
N4Op6	73	76	99	108	127	136	66	162	195	207
N4Op7	73	76	99	108	127	136	66	162	195	207
N4Op8	76	76	99	108	127	136	66	162	195	195
N4S3	76	76	99	108	127	136	66	162	195	207
N4S4	73	76	99	108	127	136	66	162	195	207
N4S7	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N4S9	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207

A1 e A2 = alelos, Op = operário, S = Soldado

Quadro A5: Castas do ninho N5 e os respectivos alelos presentes na colônia

Ninho 5										
microsat amostra	Ncor3		Vh19-1		Vh22-1		Na2296		Se5	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
N5Op1	67	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N5Op2	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N5Op4	67	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N5Op7	67	88	99	108	127	136	162	162	207	207
N5Op8	67	76	99	108	127	136	162	162	207	207
N5Op10	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N5Op11	76	76	99	108	127	136	162	162	207	207
N5Op12	76	76	99	108	127	136	162	162	207	207
N5Op14	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N5Op19	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N5S1	76	76	99	108	127	136	162	162	207	207
N5S3	76	76	99	108	127	136	162	162	207	207
N5S4	76	76	99	108	127	136	162	162	207	207
N5S5	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N5S6	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N5S8	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N5S9	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N5S10	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N5Ni11	76	76	99	108	127	136	162	162	207	207
N5Ni12	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N5Ni13	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N5Ni14	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N5Ni15	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N5Ni17	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N5Ni18	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N5Ni20	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207

A1 e A2 = alelos, Op = operário, S = Soldado, Ni = ninfa.

Quadro A6: Castas do ninho N6 e os respectivos alelos presentes na colônia

Ninho 6										
microssat amostra	Ncor3		Vh19-1		Vh22-1		Na2296		Se5	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
N6Op4	76	88	99	108	133	136	162	162	207	207
N6Op6	76	88	87	99	127	136	66	66	207	207
N6Op7	76	88	99	108	133	136	66	162	207	207
N6Op13	76	88	75	99	127	136	66	162	195	207
N6Op14	76	88	87	99	127	136	66	162	207	207
N6Op16	76	88	75	99	127	136	66	66	207	207
N6Op17	76	88	87	108	127	136	66	162	207	207
N6Op20	76	88	87	108	127	136	66	162	207	207
N6S2	76	88	75	99	127	136	66	162	195	207
N6S4	76	88	87	108	127	136	66	162	207	207
N6S5	76	88	87	99	133	136	66	162	207	207
N6S6	76	88	75	99	127	136	66	66	207	207
N6S7	76	88	99	108	127	136	66	66	195	207
N6S8	76	88	99	108	133	136	66	162	207	207
N6S9	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N6S10	76	88	87	108	127	136	66	162	195	207
N6S11	76	88	99	108	127	136	66	66	207	207
N6S18	76	88	99	108	133	136	66	162	207	207
N6S19	76	88	99	108	127	136	162	162	195	207
N6S20	76	88	99	108	127	136	66	162	195	207
N6Ni3	76	88	99	108	127	136	66	162	195	207
N6Ni4	76	88	75	99	127	136	66	162	207	207
N6Ni5	76	88	99	108	127	133	66	162	207	207
N6Ni11	76	88	75	99	127	127	66	66	207	207
N6Ni12	76	88	99	108	133	136	66	162	207	207
N6Ni14	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N6Ni16	76	88	99	108	127	136	66	66	207	207
N6E1	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N6E2	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N6E3	76	88	99	108	127	136	66	66	207	207
N6E4	76	88	99	108	127	136	66	66	207	207
N6E5	76	88	99	108	127	136	66	66	207	207
N6E6	76	88	99	108	127	136	66	66	207	207
N6E7	76	88	99	108	127	136	66	66	207	207
N6E8	76	88	99	108	127	136	66	66	207	207
N6E9	76	88	99	108	127	136	66	162	195	207
N6E10	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N6E11	76	88	99	108	127	136	66	66	195	207
N6E12	76	88	99	108	127	136	66	66	207	207
N6E13	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N6E14	76	88	99	108	127	136	66	66	195	207
N6E15	76	88	99	108	127	136	66	66	195	207
N6E16	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N6E17	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N6E18	76	88	99	108	127	127	66	162	207	207
N6E19	76	88	99	108	127	136	66	162	195	207
N6E20	76	88	99	108	127	136	66	162	195	207
N6E21	76	88	99	108	127	136	66	66	195	207
N6E22	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N6E23	76	88	99	108	127	136	66	66	207	207
N6E24	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N6E25	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207

A1 e A2 = alelos, Op = operário, S = Soldado, Ni = ninfa, E = ergatoide

QuadroA7: Castas do ninho N7 e os respectivos alelos presentes na colônia

Ninho 7										
microsat amostra	Ncor3		Vh19-1		Vh22-1		Na2296		Se5	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
N7Op1	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N7Op3	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N7Op4	76	88	99	108	127	127	66	66	207	207
N7Op5	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N7Op6	76	88	99	108	127	136	66	66	207	207
N7Op7	76	88	99	108	127	127	66	66	207	207
N7Op8	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N7S1	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N7S2	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N7S3	73	88	87	99	127	127	66	162	207	207
N7S4	76	88	87	108	127	127	66	162	207	207
N7S5	76	88	87	108	127	127	66	162	207	207
N7S6	76	76	87	108	127	127	66	162	207	207
N7S7	76	76	99	108	127	127	66	162	207	207
N7S8	73	76	99	108	127	127	66	162	207	207
N7S9	76	76	87	99	127	127	66	162	207	207
N7S10	73	76	87	108	127	127	66	162	207	207

A1 e A2 = alelos, Op = operário, S = Soldado

Quadro A8: Castas do ninho N8 e os respectivos alelos presentes na colônia

Ninho 8										
microsat amostra	Ncor3		Vh19-1		Vh22-1		Na2296		Se5	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
N8Op1	76	76	87	99	127	127	66	162	207	207
N8Op2	73	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N8Op5	76	88	87	99	127	127	66	162	207	207
N8Op8	73	76	87	99	127	127	66	162	207	207
N8Op9	76	88	87	99	127	127	66	162	207	207
N8S2	76	76	87	99	127	136	66	162	207	207
N8S4	76	88	87	99	127	136	66	162	207	207
N8S5	76	88	87	99	127	136	66	162	207	207
N8S6	76	76	87	99	127	127	66	162	207	207
N8S7	76	76	87	99	127	127	66	162	207	207
N8S8	73	76	87	99	127	136	66	162	207	207

A1 e A2 = alelos, Op = operário, S = Soldado

Quadro A9: Castas do ninho N9 e os respectivos alelos presentes na colônia

Ninho 9										
microsat amostra	Ncor3		Vh19-1		Vh22-1		Na2296		Se5	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
N9Op1	76	76	87	99	127	136	66	162	207	207
N9Op2	76	76	87	108	127	136	66	162	207	207
N9Op7	76	88	87	99	127	136	66	162	207	207
N9Op8	76	88	87	99	136	136	66	162	207	207
N9Op9	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N9Op10	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N9S1	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N9S2	76	76	87	99	136	136	66	162	207	207
N9S5	76	88	87	99	136	136	66	162	207	207
N9S6	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N9S8	76	76	99	108	136	136	66	162	207	207
N9S9	76	76	87	99	127	136	66	162	207	207
N9S10	76	76	87	99	127	136	66	162	207	207

A1 e A2 = alelos, Op = operário, S = Soldado

Quadro A10: Castas do ninho N10 e os respectivos alelos presentes na colônia

Ninho 10										
microsat amostra	Ncor3		Vh19-1		Vh22-1		Na2296		Se5	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
N10Op2	76	88	99	108	127	127	66	162	207	207
N10Op4	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N10Op5	76	76	87	99	127	136	66	162	207	207
N10Op7	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N10Op10	76	88	87	99	127	127	66	162	207	207
N10s1	76	88	99	108	127	127	66	162	207	207
N10s2	76	88	87	99	127	136	66	162	207	207
N10s3	76	88	99	108	127	136	66	162	207	207
N10s4	76	88	87	99	127	136	66	162	207	207
N10s5	76	88	87	99	127	136	66	162	207	207
N10s6	76	88	87	99	127	127	66	162	207	207
N10s8	76	88	87	99	127	127	66	162	207	207
N10s9	76	88	87	99	127	127	66	162	207	207
N10s10	76	88	87	99	127	127	66	162	207	207

A1 e A2 = alelos, Op = operário, S = Soldado

Quadro A11: Castas do ninho N11 e os respectivos alelos presentes na colônia

Ninho 11										
microsat amostra	Ncor3		Vh19-1		Vh22-1		Na2296		Se5	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
N11Op1	76	76	87	99	127	127	66	162	195	207
N11Op2	76	88	87	99	127	127	66	162	195	207
N11Op4	76	88	87	99	127	127	66	162	207	207
N11Op5	76	88	87	99	127	136	66	162	207	207
N11Op8	76	88	99	108	127	127	66	162	207	207
N11Op10	76	88	99	108	127	127	66	162	195	207
N11S3	76	76	99	108	127	136	66	162	195	207
N11S4	76	76	99	108	127	127	66	162	195	207
N11S5	76	88	87	99	127	127	66	162	195	207
N11S7	76	88	87	108	127	127	66	162	207	207
N11S8	76	88	87	99	127	127	66	162	207	207
N11S9	76	88	87	99	127	127	66	162	207	207
N11S10	76	76	99	108	127	136	66	162	207	207
N11E1	76	88	99	108	127	136	66	162	195	207
N11E2	76	88	99	108	127	136	66	162	195	207
N11E3	76	76	99	108	127	136	66	162	195	207
N11E4	76	88	99	108	127	136	66	162	195	207

A1 e A2 = alelos, Op = operário, S = Soldado, E = ergatoide

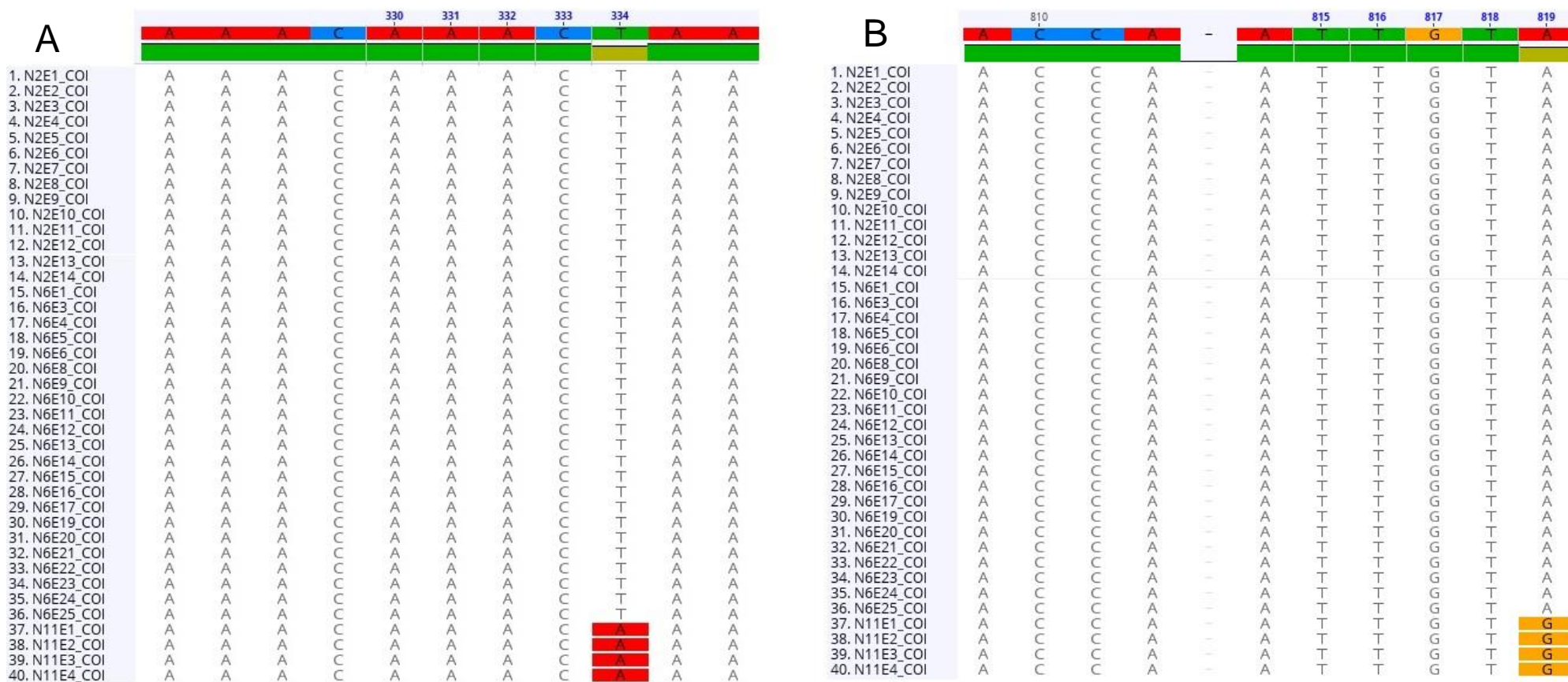


Figura A1: Haplótipos mitocondriais identificados nas colônias N2, N6 e N11, os quais possuíam neotênicos ergatoides. Enquanto as fêmeas ergatoides coletadas dos ninhos N2 e N6 compartilharam o mesmo haplótipo, as do ninho N11 mostraram um haplótipo exclusivo. Pelo fato de cada colônia apresentar somente um haplótipo, é assumido que as fêmeas ergatoides de cada colônia compartilham a mesma origem materna. A. Mutação no par de base 334. B. Mutação no par de base 819.